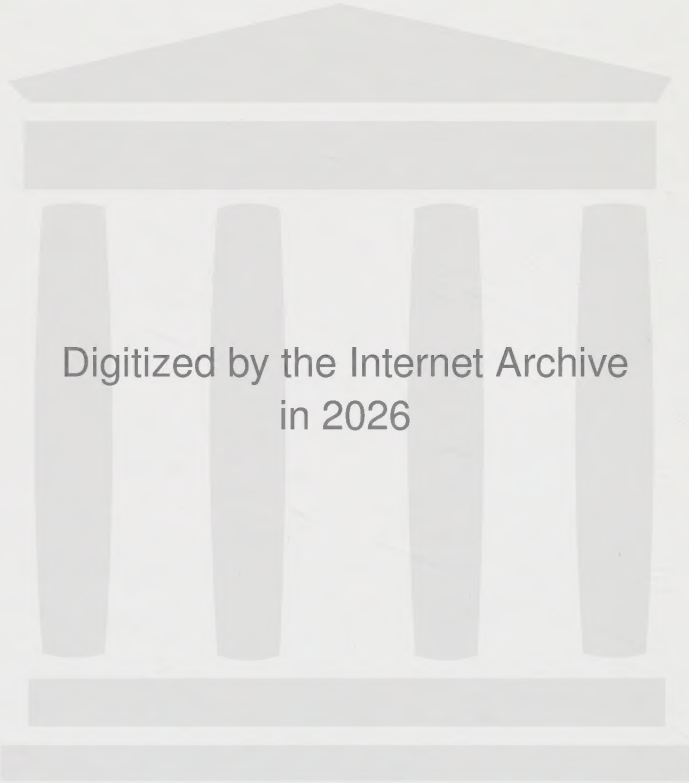


Zur mitochondrialen Proteinsynthese

**Über den Einbau von Aminosäuren in Mitochondrien
aus dem Flugmuskel der Wanderheuschrecke
und aus dem Wildtyp und der cytoplasmatischen
Mutante mi-1 von *Neurospora crassa*
in vitro und in vivo unter der Wirkung von
Cycloheximid**

Walter Sebald

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Zur mitochondrialen Proteinsynthese

Über den Einbau von Aminosäuren in Mitochondrien
aus dem Flugmuskel der Wanderheuschrecke
und aus dem Wildtyp und der cytoplasmatischen Mutante mi-1
von Neurospora crassa
in vitro und in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Walter Sebald
aus Memmingen

München 1969



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

Tag der mündlichen Prüfung: 5.2. 1970

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. rer. nat.,
Dr. med. h.c. Th. Bücher, danke ich herzlich für die
Anregungen und Diskussionen, die wesentlich zur Ent-
stehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großer Teil der Versuche wurden im Institut für
Genetik der Universität München durchgeführt. Seinem
Direktor Herrn Prof. Dr. F. Kausewitz danke ich sehr
für seine Gastfreundschaft und die großzügige Erlaub-
nis alle Einrichtungen des Instituts zu benützen.

Herrn Priv. Doz. Dr. W. Klingmüller, Herrn Dr. B.
Olbrich und Herrn R. Schweyen danke ich für ihre stets
bereitwillige Hilfe und für viele wertvolle Ratschläge.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Beteiligung von extrachromosomalen Faktoren bei der Biogenese von Zellorganellen	1
1.2. Interner und externer Beitrag zur Biogenese der mitochondrialen Proteine	2
1.2.1. Untersuchungen über das Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese <u>in vitro</u>	2
1.2.2. Untersuchungen über das Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese <u>in vivo</u>	3
1.2.2.1. Kinetik des ¹⁴ C-Aminosäureneinbaus in mitochondriale Unterfraktionen <u>in vivo</u>	3
1.2.2.2. Modifikation des internen mitochondrialen Systems in den cytoplasmatischen Mutanten von <u>Saccharomyces cerevisiae</u> und <u>Neurospora crassa</u>	4
1.2.2.3. Spezifische Hemmung der mitochondrialen oder extramitochondrialen Proteinsynthese durch Antibiotika	6
2. Plan	8
2.1. Gelelektrophoretische Trennung der mitochondrialen Membranen und Lokalisierung der <u>in vitro</u> inkorporierten ¹⁴ C-Aminosäuren in den Proteinbanden	8
2.2. Nachweis einer mitochondrialen Proteinsynthese <u>in vivo</u> nach Hemmung der extramitochondrialen Proteinsynthese durch Cycloheximid	8
3. Ergebnisse	10
3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese der unlöslichen Mitochondrienproteine in einem Phenolmedium	10
3.1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Methode	10
3.1.2. Elektrophoresemuster der unlöslichen Mitochondrienproteine aus der Rattenleber, aus dem Heuschreckenflugmuskel und aus <u>Neurospora crassa</u> , Wildtyp	11

	Seite
3.1.3. Vergleich der Elektrophoresemuster der unlöslichen Mitochondrienproteine aus Wildtyp und cytoplasmatischen Mutanten von <u>Neurospora crassa</u>	12
3.2. <u>In vitro</u> -Einbau von 14-C-Aminosäuren in das Protein isolierter Mitochondrien	13
3.2.1. Einbau von 14-C-Aminosäuren in Mitochondrien isoliert aus Wildtyp und cytoplasmatischer Mutante <u>mi-1</u> von <u>Neurospora</u>	13
3.2.2. Verteilung der <u>in vitro</u> eingebauten Aminosäuren auf lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine aus Wildtyp und Mutante <u>mi-1</u> von <u>Neurospora</u>	17
3.2.3. Verteilung der <u>in vitro</u> eingebauten Aminosäuren auf die Banden der elektrophoretisch aufgetrennten unlöslichen Mitochondrienproteine aus Wildtyp und Mutante <u>mi-1</u> von <u>Neurospora</u>	18
3.2.4. Vergleich der <u>in vitro</u> -Markierungsmuster von <u>Neurospora</u> -Wildtyp-, Rattenleber- und Heuschreckenflugmuskel-Mitochondrien	22
3.3. Untersuchungen zum mitochondrialen Aminosäureeinbau <u>in vivo</u> nach Hemmung der extramitochondrialen Proteinsynthese mit Cycloheximid. Versuche mit <u>Neurospora</u> -Wildtyp und Heuschreckenflugmuskel	24
3.3.1. Wirkung von Cycloheximid auf den <u>in vivo</u> -Einbau von 14-C-Aminosäuren in cytosolische und mitochondriale Proteine	24
3.3.2. Verteilung der Cycloheximid-resistenten Markierung auf lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine	26
3.3.3. Verteilung der <u>in vivo</u> eingebauten 14-C-Aminosäuren auf die Banden der elektrophoretisch aufgetrennten unlöslichen Mitochondrienproteine	30
3.3.4. Wirkung von Cycloheximid auf den mitochondrialen Aminosäureeinbau <u>in vivo</u>	33
4. Experimenteller Teil	36
4.1. Gelelektrophorese	36
4.2. Kultur von Heuschrecken und <u>Neurospora</u>	38

	Seite
4.3. Isolierung von Mitochondrien, Präparation der unlöslichen Mitochondrienproteine und der Zellsaftproteine	41
4.4. <u>In vitro</u> -Einbau von ^{14}C -Aminosäuren	43
4.5. <u>In vivo</u> -Einbau von ^{14}C -Aminosäuren	43
4.5.1. Versuche mit Heuschrecken	43
4.5.2. Versuche mit <u>Neurospora</u>	44
4.6. Bestimmungsmethoden	44
4.7. Materialien	44
4.8. Apparate	45
5. Diskussion	46
5.1. Bedeutet der mitochondriale Aminosäureneinbau eine mitochondriale Proteinsynthese ?	46
5.2. Zahl, Größe und Menge der mitochondrial synthetisierten Proteine	46
5.3. Änderung des Markierungsmusters in den Mitochondrien aus der <u>mi-1</u> -Mutante von <u>Neurospora</u>	49
5.4. Vergleich der Markierung <u>in vitro</u> mit der Markierung <u>in vivo</u> unter der Wirkung von Cycloheximid	50
5.5. Verhalten der mitochondrialen Proteinsynthese <u>in vivo</u> unter der Wirkung von Cycloheximid	51
5.6. Mögliche Funktionen der mitochondrial synthetisierten Proteine	52
6. Zusammenfassung	54
7. Literaturverzeichnis	56

1. Einleitung

1.1. Beteiligung von extrachromosomalen Faktoren bei der Biogenese von Zellorganellen

Die Synthese von einzelnen Proteinmakromolekülen und auch von Multienzymkomplexen, sowie die Vererbung der dazu nötigen genetischen Information kann heute im wesentlichen beschrieben werden durch die biochemischen Modelle über die Mechanismen der Replikation, Transskription und Translation, sowie durch die Chromosomentheorie der Vererbung.

Im Unterschied dazu tragen bestimmte übermolekulare Einheiten der Zelle mit extrachromosomaler, eigener Information zu ihrer Bildung bei. Dies wurde zum ersten Mal vermutet, als C. Correns 1909 bei seinen Arbeiten mit grün-weiß gescheckten Pflanzen von Mirabilis jalapa ein Beispiel für einen Erbgang entdeckte, der nicht den Mendelschen Gesetzen folgt. Die Farbe der Blätter, also die Fähigkeit der Chloroplasten, Chlorophyll zu bilden, wurde bei seinem Objekt immer nur durch die Blüte übertragen, nicht aber durch den Pollen.

Die Entdeckung von Desoxyribonukleinsäure in verschiedenen Zellorganellen (Chloroplasten, Mitochondrien, Kinetoplasten) hat diese Vermutung weiter untermauert (Wilkie, 1964; Granick et al., 1967; Borst et al., 1968; Nass, 1969). Darüber hinaus wurden in Chloroplasten (Eisenstadt et al., 1964; Spencer, 1965; Schwartz et al., 1967; Ellis, 1969) und Mitochondrien (Roodyn et al., 1968) ein vollständiger Apparat für die Proteinsynthese gefunden. Dies hat zu der Anschauung geführt, daß diese Organellen über ein internes System sowohl für die Übertragung als auch die Ausprägung genetischer Information verfügen.

Da auch chromosomale Faktoren bei der Biogenese dieser Organellen mitwirken (Mitchell et al., 1953; Wettstein, 1961; Sherman et al., 1964), müssen das interne System der Organelle und das externe System, das vom Kern gesteuert wird, bei der Biogenese zusammenwirken. Folglich stehen wir vor der Frage: Was steuert das interne System und was steuert das externe System zur Biogenese der Organelle bei ?

1.2. Interner und externer Beitrag zur Biogenese der mitochondrialen Proteine

Im Falle der Mitochondrien, dem Objekt der vorliegenden Arbeit, ist diese Frage bereits von vielen Arbeitsgruppen untersucht worden. Es sind dazu verschiedene Wege eingeschlagen worden. Die angewandten Methoden sowie die dabei erhaltenen Resultate sind im folgenden kurz beschrieben.

1.2.1. Untersuchungen über das Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese in vitro

Mitochondrien aus den verschiedensten Organismen inkorporieren in vitro, aus dem Zellverband isoliert, radioaktive Aminosäuren in mit Trichloressigsäure fällbares Material (Mc Lean et al., 1958; Roodyn et al., 1961; Truman et al., 1962; Kroon, 1963; Bronsert et al., 1966; Wintersberger, 1965; Wheeldon et al. 1966; Beattie et al., 1967a). Wie zuerst für Rattenlebermitochondrien beschrieben, wird weniger als 5 % der eingebauten Aminosäuren in den extrahierbaren Mitochondrienproteinen wiedergefunden (Roodyn et al., 1962). Werden die extrahierbaren Proteine chromatographisch aufgetrennt, so ist diese geringe Radioaktivität mit keiner Fraktion angereichert (Kadenbach, 1966). Die löslichen Enzyme Cytochrom c und Malatdehydrogenase werden nicht markiert (Roodyn et al., 1962). In die äußere Mitochondrienmembran wird ebenfalls keine signifikante Menge an Aminosäuren eingebaut (Beattie et al., 1967b; Neupert et al. 1967). Von den Enzymen der inneren Mitochondrienmembran werden

die Cytochromoxidase und die Succinatdehydrogenase nicht in vitro synthetisiert (Kadenbach 1966).

In einer Proteinfraction, die Strukturprotein genannt worden ist (Criddle, 1962), wurde eine vierfache Anreicherung der spezifischen Radioaktivität, bezogen auf ganze Mitochondrien, gefunden (Kadenbach, 1966; Wheeldon et al., 1966; Beattie et al., 1967b). Diese Fraktion ist jedoch weder ein einheitliches Protein (Haldar et al., 1966; Mac Lennan et al., 1968) noch ist es funktionell eindeutig charakterisiert. Möglicherweise handelt es sich um denaturiertes Protein (Schatz, 1967).

Ein hoher Anteil der eingebauten Radioaktivität wurde in den mitochondrialen Ribosomen gefunden (O'Brien et al., 1967). Da diese Radioaktivität jedoch hauptsächlich mit den Polysomen assoziiert ist (Küntzel et al., 1967) und durch Puromycin abgelöst werden kann (Neupert et al., 1969), handelt es sich um noch nicht zu Ende synthetisierte Peptidketten.

Damit ist noch ungeklärt, ob in vitro überhaupt vollständige Peptidketten gebildet werden und wenn ja, ob sie zu funktionsfähigen Proteinen integriert werden.

1.2.2. Untersuchungen über das Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese in vivo

1.2.2.1. Kinetik des ¹⁴C-Aminosäureeinbaus in mitochondriale Unterfraktionen in vivo

Nach Zugabe einer radioaktiven Aminosäure befindet sich alle in Protein eingebaute Radioaktivität zunächst an den Ribosomen, dem Ort der Synthese. Die mit den Ribosomen assoziierte Radioaktivität nimmt jedoch sofort ab, wenn die freie ¹⁴C-Aminosäure verbraucht ist oder durch die entsprechende unmarkierte Aminosäure verdünnt wird. Die radioaktiven Proteine benötigen dann eine bestimmte Zeit, bis

sie in den anderen Zellfraktionen erscheinen (Zilversmit et al., 1943).

Auf diese Weise wurde gezeigt, daß Mitochondrien Proteine importieren, besonders in die lösliche Fraktion (Beattie, 1968).

Wird einer Ratte 14-C-Lysin injiziert, so besitzt Cytochrom c, isoliert aus der Mikrosomenfraktion, am Anfang der Markierungsperiode eine hohe spezifische Radioaktivität, die dann rasch wieder abnimmt. Die Markierung des mitochondrialen Cytochrom c dagegen nimmt über die ganze untersuchte Zeit langsam zu (Kadenbach, 1968). Dies zeigt, daß das Apoprotein von Cytochrom c und den extramitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird und dann in die Mitochondrien einwandert.

In den mitochondrialen Membranen wurde eine Fraktion gefunden, die eine Markierungskinetik zeigt wie die extramitochondrialen Ribosomen (Henson et al., 1968). Sie enthält demnach die mitochondrialen Ribosomen.

1.2.2.2. Modifikation des internen mitochondrialen Systems in den cytoplasmatischen Mutanten von Saccharomyces cerevisiae und Neurospora crassa

Bei Saccharomyces cerevisiae und bei Neurospora crassa sind cytoplasmatische Mutanten bekannt. Die Änderungen im Phänotyp dieser Mutanten werden durch die Änderungen oder den Verlust eines genetischen Faktors verursacht, der bei Kreuzungen der Mutante mit dem Wildtyp nicht nach den Mendelschen Gesetzen vererbt wird. Alle Beobachtungen weisen darauf hin, daß diesen genetische Faktor die mitochondriale Desoxyribonukleinsäure ist (Mounolou et al., 1966; Reich et al., 1966).

Die "petite"-Mutanten der Hefe wachsen nur auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Die enzymatischen Aktivitäten und die Spektren der strukturgebundenen Cytochrome a/a_3 , b und c_1 sind verschwunden (Ephrussi, 1953). Daraus wurde geschlossen, daß diese Cytochrome auf der mito-

chondrialen Desoxyribonukleinsäure kodiert sind und in den Mitochondrien synthetisiert werden (Clark-Walker et al., 1967). In den "petite"-Mitochondrien wurde jedoch ein Protein gefunden, das im Kupfergehalt, in der Fällbarkeit mit Ammoniumsulfat, auf der Molekularsiebchromatographie und auf der Gelelektrophorese nicht vom Apoprotein der Cytochromoxidase zu unterscheiden ist. Es wurde nachgewiesen, daß in "petite"-Mitochondrien wieder die enzymatische Aktivität der Cytochromoxidase erscheint, wenn die Mitochondrien zuvor mit Cytohämin inkubiert werden. Nach diesen Befunden ist in der "petite"-Mutante die Synthese der Hämgruppe gestört, nicht aber die Bildung des zugehörigen Apoproteins (Tuppy et al., 1969). In der anaerob gewachsenen Wildtyp-Hefe fehlen ebenfalls die strukturgebundenen Cytochrome (Schatz, 1968; Criddle et al., 1969). Es ist daher unklar, ob der Ausfall der Cytohäminsynthese direkt durch die "petite"-Mutation verursacht wird, oder ob durch die "petite"-Mutation die Fähigkeit der Hefe zu atmen gestört ist und dann durch sekundäre Regulationsmechanismen die Synthese von Cytohämin gehemmt wird.

Sorgfältig untersucht ist das Verhalten der mitochondrialen ATPase sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen im Wildtyp und der "petite"-Mutante (Schatz, 1968; Criddle et al., 1969). Hier zeigt es sich, daß im Wildtyp unter beiden Wachstumsbedingungen die ATPase kältestabil und Oligomycin-hemmbar ist, während in der "petite"-Mutante unter beiden Bedingungen die ATPase kältestabil und durch Oligomycin nicht hemmbar ist. Diese Befunde weisen darauf hin, daß der Faktor, der die ATPase kältestabil und hemmbar durch Oligomycin macht, unabhängig von den Wachstums- und Stoffwechselbedingungen synthetisiert wird. Da er in der "petite"-Mutante nicht mehr gefunden wird, scheint er auf der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure kodiert zu sein.

Die "mi"-Mutanten bei Neurospora (maternally inherited mutants; Mitchell et al., 1952) zeigen ebenfalls eine verän-

derte Atmungskette. Die Mitochondrien der mi-1 -Mutante besitzen einen hohen Gehalt an Cytochrom c, während die Spektren der Cytochrome a/a₃, b und c₁ bis auf Spuren verschwunden sind. In der Mutante mi-3 fehlt im Spektrum nur die Absorption von Cytochrom a/a₃ (Mitchell et al., 1952; Haskins et al., 1953; Tissieres et al., 1953). Aus den Mitochondrien der Mutanten wurde das Strukturprotein isoliert (Woodward et al., 1966). Nach einer Bruttoamino-säurenanalyse wurde in dem Strukturprotein der mi-1 -Mitochondrien der Austausch von Tryptophan gegen Cystein im Vergleich zum Wildtypprotein gefunden, in der mi-3 - Mutante der Verlust eines Tryptophanrestes. Daraus wurde geschlossen, daß die mi-1 - und mi-3 - Mutationen von Veränderungen der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure herrühren, die den Aminosäurenaustausch verursachen. Derartige Änderungen entsprächen den Punktmutationen der chromosomalen Gene. Die polyphänen Änderungen in der Atmungskette werden dadurch erklärt, daß in dem Strukturprotein durch den Aminosäurenaustausch Bindungsstellen für die Cytochrome verloren gehen. Präparationen von Strukturprotein können jedoch auf der Gellektrophorese in mehrere Komponenten aufgespalten werden (Halдар et al., 1966; Mac Lennan et al., 1968). Daher ist die experimentelle Grundlage für die beschriebene Erklärung der mi -Mutation anfechtbar.

1.2.2.3. Spezifische Hemmung der mitochondrialen oder der extramitochondrialen Proteinsynthese durch Antibiotika.

Bestimmte Hemmstoffe der Proteinsynthese zeigen eine Spezifität für einen bestimmten Ribosomentyp. So hemmt Chloramphenicol nur Ribosomen aus prokariotischen Zellen (Hahn, 1967), Cycloheximid dagegen nur Ribosomen aus eukariotischen Zellen (Siegel et al., 1967). Mitochondriale Ribosomen verhalten sich in diesem Zusammenhang wie Ribosomen aus prokariotischen Zellen (Clark-Walker et al., 1966).

Chloramphenicol hemmt die mitochondriale Proteinsynthese in vitro (Kroon, 1963; Wintersberger, 1965; Wheeldon et al., 1966; Lamb et al., 1968). Bei in vivo-Gabe von Chloramphenicol entstehen bei Saccharomyces cerevisiae Zellen, denen wie in der "petite"-Mutante die strukturgebundenen Cytochrome fehlen (Clark-Walker et al., 1967). Auf Zellen der "petite"-Mutante hat Chloramphenicol keinen Einfluß.

An Rattenleberschnitten wurde gezeigt, daß Chloramphenicol die Synthese der unlöslichen Mitochondrienproteine stärker hemmt, als die Synthese der übrigen Zellproteine (Beattie, 1968).

Cycloheximid hemmt die Proteinsynthese in eukariotischen Zellen in vivo und in vitro (Siegel et al., 1965). Die Proteinsynthese in isolierten Mitochondrien wird von dem Antibiotikum nicht beeinflußt (Beattie et al., 1967; Lamb et al., 1968). Desweiteren sind Versuche mit Rattenleberschnitten und mit Neurospora crassa beschrieben, in denen gezeigt wird, daß Cycloheximid auch in vivo den Aminosäureneinbau in die mitochondrialen Proteine weniger hemmt als den Einbau in die übrigen Zellproteine (Beattie, 1968; Küntzel, 1969).

Die Proteine der mitochondrialen Ribosomen (Küntzel, 1969; Neupert et al., 1969 und der Cytochromoxidase (Birkmayer et al., 1969) werden in vivo in Gegenwart von Cycloheximid nicht durch ¹⁴C-Aminosäuren markiert. Daraus wurde geschlossen, daß diese Proteine über die Cycloheximid-hemmbar, extra-mitochondriale Proteinsynthese gebildet werden.

2. Plan

2.1. Gelelektrophoretische Trennung der mitochondrialen Membranen und Lokalisierung der in vitro inkorporierten ¹⁴C-Aminosäuren in den Proteinbanden.

Wie in der Einleitung dargelegt, werden die von isolierten Mitochondrien inkorporierten Aminosäuren in den Membranen wiedergefunden. Soll das markierte Produkt weiter untersucht werden, sieht man sich folglich der Aufgabe gegenüber, die mitochondrialen Membranen zu fraktionieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die mitochondrialen Membranproteine mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Phenol-Ameisensäuremedium im analytischen Maßstab aufgetrennt.

Untersucht wurden zunächst die Markierungsmuster von Mitochondrien aus der Rattenleber und dem Flugmuskel der Wanderheuschrecke, für welche die Bedingungen für den in vitro-Einbau von Aminosäuren gut ausgearbeitet waren.

Besonders lohnend erschien es, die mitochondriale Proteinsynthese in Neurospora crassa zu untersuchen. Dieser Mikroorganismus bietet die Möglichkeit, Mitochondrien auf einfache Weise in großer Menge zu isolieren. Im Zusammenhang mit den genetischen Befunden über die cytoplasmatischen Mutanten mi-1 und mi-3 war es interessant zu wissen, in wie weit die Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese durch die Mutation verändert sind. Es wurde zunächst für den Wildtyp und die Mutante mi-1 ein Inkubationsmedium entwickelt, in dem die isolierten Mitochondrien hohe Syntheseraten zeigten. Dann wurden die Markierungsmuster von Wildtyp und Mutante mi-1 mit Hilfe der Gelelektrophorese verglichen.

2.2. Nachweis einer Mitochondrialen Proteinsynthese in vivo nach Hemmung der extramitochondrialen Proteinsynthese mit Cycloheximid

Ziel dieser Untersuchungen war es, die in vitro erhaltenen

Befunde mit einer unabhängigen Methode in vivo nachzuprüfen. Dies gelang, als es sich zeigte, daß in vivo noch eine mitochondriale Proteinsynthese abläuft, wenn die extramitochondriale Proteinsynthese bis zu 99 % durch Cycloheximid gehemmt ist. Die Experimente wurden mit Wanderheuschrecken und mit Neurospora crassa durchgeführt. Die Ergebnisse mit beiden Organismen bestätigen die Resultate der in vitro-Experimente. Es wird nur ein Teil der mitochondrialen Membranen von der internen mitochondrialen Proteinsynthese gebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese der unlöslichen Mitochondrienproteine in einem Phenolmedium

3.1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Methode

Mitochondrien lassen sich einfach in lösliche und unlösliche Proteine fraktionieren. Nach Zerreißen der Membranen durch Ultraschall oder durch Einfrieren werden die Matrix- und Interchristaeproteine durch Puffer genügend hoher Ionenstärke extrahiert.

Eine Fraktionierung der unlöslichen Mitochondrienproteine mit den klassischen Methoden der Proteinchemie bereitet große Schwierigkeiten. Wir erhielten in unseren Versuchen eine gute Auftrennung mit einer Gelelektrophorese in einem Phenol-Ameisensäure-Medium. Dieses System war erfolgreich für die Fraktionierung von Ribosomenproteinen (Work, 1964) und von Membranproteinen aus Chloroplasten (Bauer et al., 1967) angewendet worden.

In dem Phenolmedium läßt sich Acrylamid nicht polymerisieren. Daher konnte die Diskelektrophorese-Technik nicht angewendet werden, bei der das Gel direkt in Röhrchen einpolymerisiert wird. So wurde das Phenolmedium in vorgegossene Platten eindialysiert. Das Auflösungsvermögen der horizontal durchgeführten Elektrophorese ist nicht so gut wie beim "Diskverfahren". Dafür ergeben sich andere Vorteile. Durch das Dialysieren wird das Gel von den zum Polymerisieren notwendigen Peroxyden freigewaschen. Proben, die auf dem gleichen Gel gelaufen sind, können exakt verglichen werden. Die angefärbten Gele sind gut zu Densitometrieren. Die rechteckigen Gelplatten können zur Bestimmung von Radioaktivitätsverteilungen leicht in Scheiben geschnitten werden. Die Gelplatten lassen sich eintrocknen. Dies ist notwendig, wenn die Pherogramme zur Autoradiographie exponiert werden.

3.1.2. Elektrophoresemuster der unlöslichen Mitochondrienproteine aus der Rattenleber, aus dem Heuschreckenflugmuskel und aus Neurospora crassa, Wildtyp

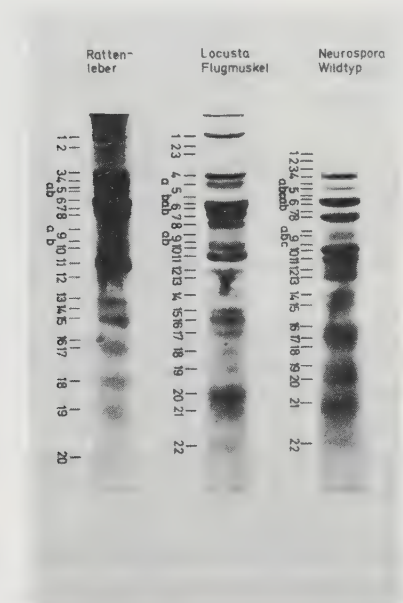


Abb. 1. Unlösliche Mitochondrienproteine aus der Rattenleber, aus dem Heuschreckenflugmuskel und aus Neurospora crassa, Wildtyp, nach gelelektrophoretischer Trennung und Anfärbung mit Amidoschwarz. Aufgetragen wurden je 100 µg Protein in 10 µl Phenolmedium in einem 0,5 x 10 mm großen Auftragspalt, alle drei Proben auf dem gleichen Gel. Es wurde 6 Std. bei 7 Volt/cm getrennt.

Die unlöslichen Proteine werden in 20-25 Banden aufgetrennt, die wie in Abb. 1 durchnummeriert wurden. Die Bande mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit erhielt die Nummer 1. Bei besonders gut gelungenen Trennungen spalten einzelne Banden weiter auf. Dies wurde durch zusätzliche Buchstaben gekennzeichnet.

Die Proteine wandern fast vollständig in das Gel ein. Die Menge Protein, die am Start liegen bleibt, ist weniger als 5 %.

Die Proteinmuster der gezeigten Membranen sind typisch für jede Mitochondrienart. Gemeinsam ist allen drei Mustern eine intensive Bande 6, eine zweite ungefähr gleich starke Bande im Bereich der Banden 10-12 und eine mittelstarke Bande 4.

Eine Zuordnung von einzelnen Banden zu funktionell definierten Proteinen ist bis jetzt nur in Einzelfällen möglich. Bei einer Präparation von Strukturprotein (Criddle et al., 1962) aus Neurospora werden die Banden 10 und 11 angereichert, bei der Isolierung von Cytochromoxydase (Birkmayer et al., 1968) aus Neurospora die Banden 16 und 18.

3.1.3. Vergleich der Elektrophoresemuster der unlöslichen Mitochondrienproteine aus Wildtyp und cytoplasmatischen Mutanten von Neurospora crassa

Wie eingangs erwähnt, fehlen bei den cytoplasmatischen Mutanten von Neurospora die Aktivitäten bestimmter strukturgebundener mitochondrialer Enzyme. Wie in Abb. 2 dargestellt, zeigen sich in den Membranen außerdem Unterschiede im Proteinmuster. In der mi-1-Mutante enthalten die Banden 4,8 und 10 weniger, die Banden 12 und 15 mehr Protein als im Wildtyp. Das Proteinmuster der mi-3-Mutante ist nicht so stark verändert, wie das der mi-1-Mutante. Hier sind die Proteine in den Banden 8 und 10 annähernd gleich stark vertreten wie im Wildtyp.

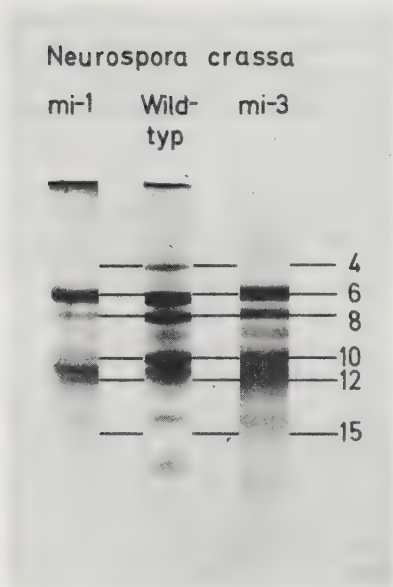


Abb. 2. Unlösliche Mitochondrienproteine aus Wildtyp und cytoplasmatischen Mutanten mi-1 und mi-3 von Neurospora nach gelelektrophoretischer Trennung und Anfärbung mit Amidoschwarz. Versuchsbedingungen wie in Abb. 1.

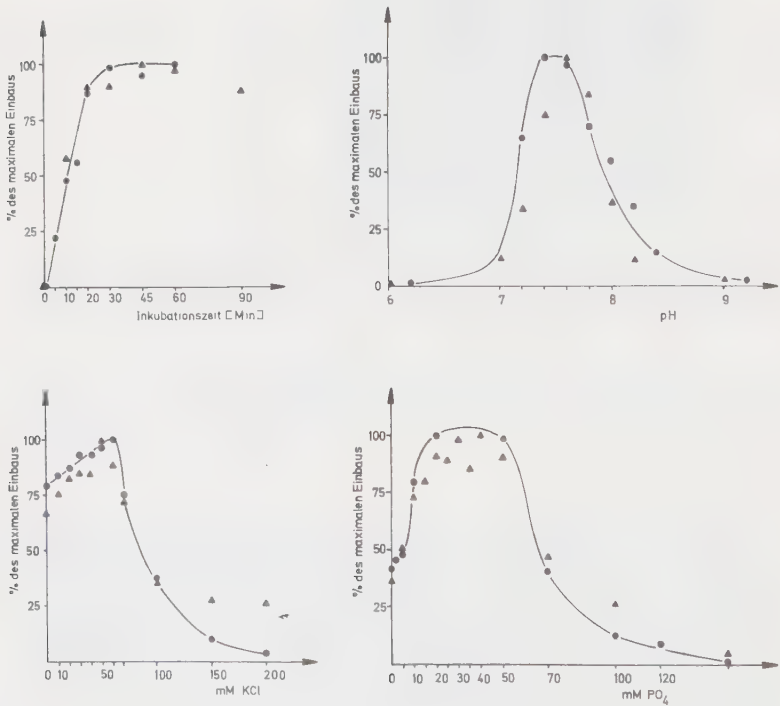
3.2. In vitro-Einbau von 14 C-Aminosäuren in das Protein isolierter Mitochondrien

3.2.1. Einbau von 14 C-Aminosäuren in Mitochondrien isoliert aus Wildtyp und cytoplasmatischer Mutante mi-1 von Neurospora

Für die Mitochondrien der Rattenleber (Neupert, 1967; Wheelodon et al., 1966) und des Heuschreckenflugmuskels (Bronsert et al., 1966) sind die Inkubationsbedingungen bekannt, unter denen in vitro Aminosäuren mit hoher Geschwindigkeit eingebaut werden. Der mitochondriale Aminosäureeinbau in Neurospora war bis dahin noch nicht untersucht. Im Falle der cytoplasmatischen Mutante war es überhaupt unsicher, ob ihre Mitochondrien Aminosäuren inkorporieren.

Die Mitochondrien wurden unter möglichst schonenden Bedingungen isoliert. Das Chitingerüst der Hyphen wurde mit Helicase angebaut. Die entstandenen Sphäroplasten ließen sich dann durch Homogenisieren leicht aufbrechen (Greenawalt et al., 1967).

Die Abhängigkeit des Aminosäureneinbaus von den wesentlichen bekannten Parametern ist in den folgenden Abbildungen zusammengestellt.



(Legende siehe S. 15)

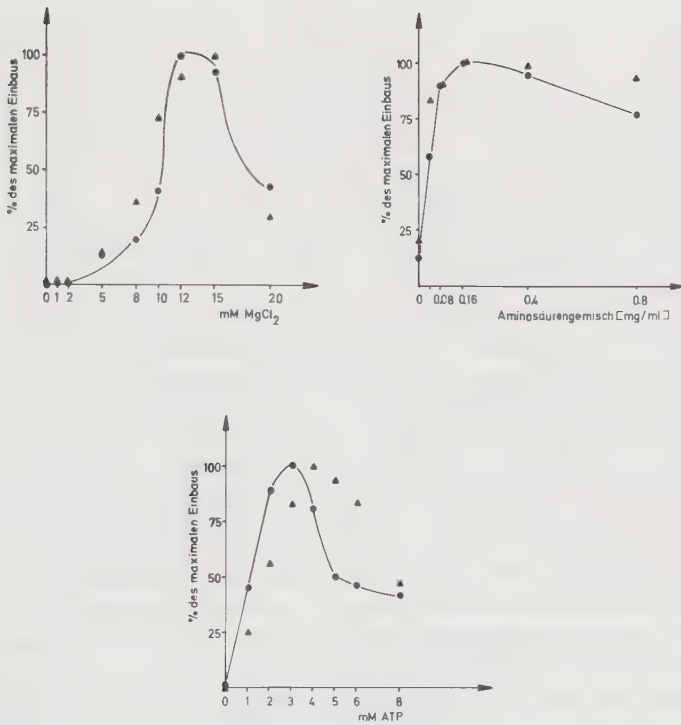


Abb. 3a-g. Abhängigkeit des in vitro-Einbaus von ¹⁴-C-Leucin in mitochondriales Protein von der Inkubationszeit, dem pH-Wert und der Konzentration an KCl, MgCl₂, Phosphat, Aminosäurengemisch und ATP im Inkubationsmedium.

●-● Wildtyp; ▲ -▲ Mutante mi-1.

Inkubationsbedingungen: Saccharose 100 mM, KCl 50 mM, Tri-äthanolaminpuffer 30 mM, Äthylendiamintetraacetat 2 mM, Kaliumphosphat 20 mM, MgCl₂ 10 mM, Aminosäurengemisch (Leucinfrei) 0,3 mg pro ml, ATP 4 mM, Serumbalbumin 1,5 mg pro ml, ¹⁴-C-Leucin (u. 251 mC/mMol) 0,2 µC, ca. 1 mg Mitochondrienprotein pro ml. Es wurde 30 Min. bei 30°C inkubiert. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt. Jeweils ein Parameter wurde variiert, wie aus den Abbildungen ersichtlich.

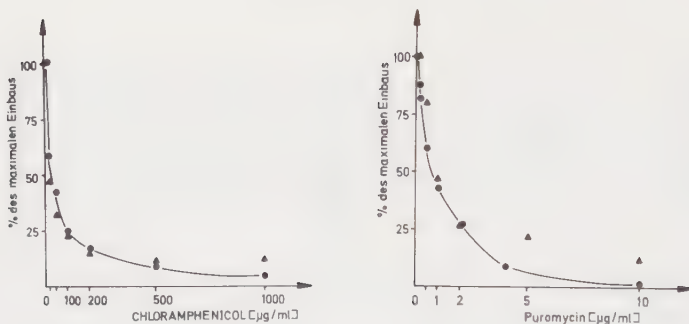


Abb. 4a,b. Abhängigkeit des in vitro-Einbaus von 14 -C-Leucin von der Konzentration an Chloramphenicol und Puromycin im Inkubationsmedium.

●-● Wildtyp; ▲ - ▲ Mutante mi-1

Inkubationsbedingungen wie in Abb. 3.

Es zeigte sich, daß Mitochondrien aus der Mutante mi-1 ebenso wie die aus dem Wildtyp Aminosäuren inkorporieren. In den Einbaubedingungen wurde kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Mutante gefunden.

Chloramphenicol und Puromycin hemmten den Einbau in beiden Mitochondrien im gleichen Ausmaß. In beiden Fällen war der Einbau resistent gegen Cycloheximid bis zu Konzentrationen von 1 mg pro ml.

Unterschiedlich waren die Einbauraten (Abb. 5a,b). Bei optimaler Konzentration an Leucin wurden von den Wildtyp-Mitochondrien, bezogen auf die Syntheserate in den ersten 10 Min., 450 pMol Leucin pro Std. und mg Mitochondrienprotein eingebaut, von den mi-1-Mitochondrien 90 pMol Leucin pro Std. und mg Mitochondrienprotein. Halbmaximaler Einbau wurde in beiden Fällen bei einer Leucinkonzentration von 5 nMol pro ml Inkubationsmedium beobachtet.

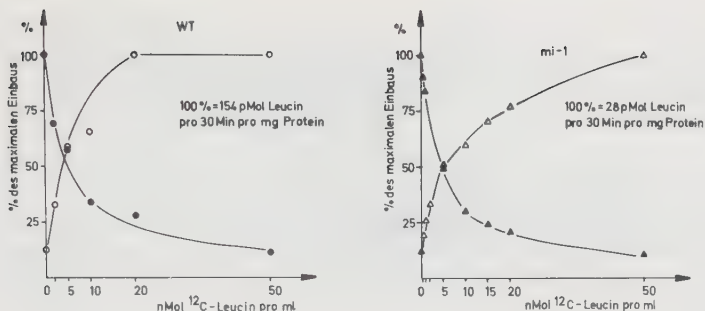


Abb. 5a,b. Abhängigkeit des in vitro-Einbaus von ¹⁴C-Leucin von der Konzentration an ¹²C-Leucin im Inkubationsmedium.

● - ● Wildtyp; ▲ - ▲ Mutante mi-1.

Inkubationsbedingungen wie in Abb. 3.

Berechneter Einbau an Gesamtleucin.

○ - ○ Wildtyp; △ - △ Mutante mi-1

3.2.2. Verteilung der in vitro eingebauten Aminosäuren auf lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine aus Wildtyp und Mutante mi-1 von Neurospora

	Ipm pro mg Protein	Gesamt- protein mg	Ipm gesamt
<u>Wildtyp-Mitochondrien</u>			
lösliche Proteine	2,300	7,8	18,000
unlösliche Proteine	92,000	8,6	790,000
<u>mi-1-Mitochondrien</u>			
lösliche Proteine	520	8,9	4,600
unlösliche Proteine	7,400	6,8	50,000

Tab. 1. Inkubationsbedingungen wie in Abb. 2, mit der Ausnahme, daß 1 μ C pro ml Leucin (u. 251 mC/mMol), 1 μ C pro ml

Isoleucin (u. 262 mC/mMol) und 1 μ C pro ml Phenylalanin (u. 366 mC/mMol) eingesetzt wurden, und das Aminosäurengemisch daher kein Leucin, Isoleucin und Phenylalanin enthielt.

Beim Wildtyp wurden über 95 % der inkorporierten Aminosäuren in den unlöslichen Proteinen wiedergefunden, bei der Mutante mi-1 90 %. Nur die unlösliche Fraktion wurde weiter untersucht.

3.2.3. Verteilung der in vitro eingebauten Aminosäuren auf die Banden der elektrophoretisch aufgetrennten unlöslichen Mitochondrienproteine aus Wildtyp und Mutante mi-1 von Neurospora

Trennt man die markierten Membranproteine mit der in 3.1. beschriebenen Gelelektrophorese auf, so kann man im Gel die Verteilung der Radioaktivität bestimmen. Dies wurde auf zwei Arten durchgeführt. Einmal wurde das angefärbte Pherogramm in gleiche etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in diesen die Radioaktivität bestimmt. Hier ist eine exakte quantitative Auswertung möglich. Schlecht ist das Auflösungsvermögen. Eng beieinander liegende Banden werden von den Schnitten nicht mehr aufgelöst. Letzteres gelingt mit der Autoradiographie. Autoradiographien lassen sich jedoch nicht ohne weiteres quantitativ auswerten. So wurde die Autoradiographie für die qualitative Charakterisierung der radioaktiven Banden herangezogen, die direkte Radioaktivitätsbestimmung nach Schneiden des Gels für die quantitative Auswertung.

Die Autoradiographie der Pherogramme der Membranen sowohl vom Wildtyp als auch der Mutante (Abb. 6) zeigt, daß die in vitro eingebaute Radioaktivität in bestimmten Banden konzentriert ist. Alle Radioaktivitätsbanden lassen sich Proteinbanden zuordnen. Im Wildtyp zeigt die höchste Markierung die Bande 4, außerdem sind noch hoch markiert die Banden 3, 6a, 7 und 8. Schwach markiert sind die Banden 1,2,9c,13, 15 und 19.

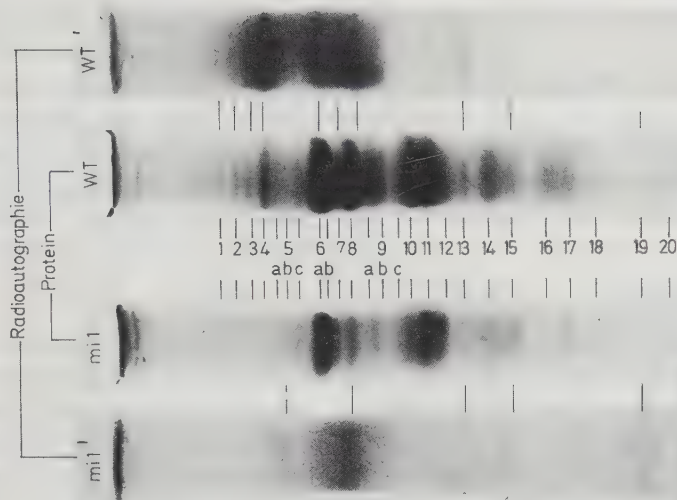


Abb. 6. Bandenmuster der in vitro markierten unlöslichen Mitochondrienproteine aus Wildtyp und Mutante mi-1 von Neurospora nach gelelektrophoretischer Trennung. Außen Autoradiographie, innen Amidoschwarzfärbung.

Aufgetragen wurden 100 µg Wildtypprotein mit 9,000 Ipm und ca. 70 µg mi-1-Protein mit 600 Ipm. Für die Autoradiographie wurde das Wildtyp-Pherogramm 1 Woche exponiert, das mi-1-Pherogramm 4 Wochen.

Die Mitochondrien wurden markiert wie in Tabelle 1 angegeben.

Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität (Abb. 7 unten) ergab, daß 13 % in der Bande 4, 8 % in der Bande 6 und 12 % in den Banden 7 und 8 lokalisiert sind. Der Rest verteilt sich auf die Auftragsstelle (weniger als 5 %) und die anderen

schwächeren Banden. Auffälligerweise findet man fast die gesamte Radioaktivität im langsam wandernden Teil der Proteine.

In der Mutante mi-1 ist das Markierungsmuster verändert. Die Bande 8 ist am höchsten markiert (20 % der gesamten Radioaktivität). Schwache Maxima der Radioaktivität sind in den Banden 5, 9c, 13, 15 und 19 sichtbar. Die Radioaktivität in Position der Bande 4 ist fast ganz verschwunden.

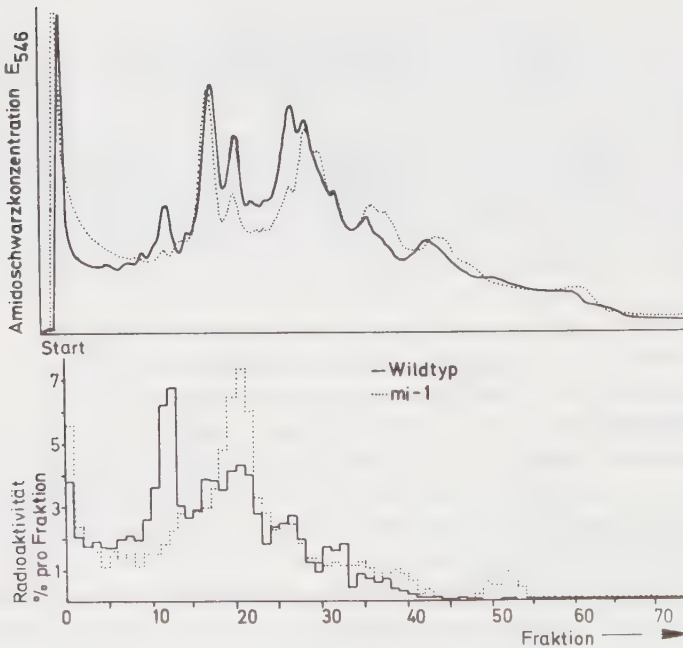


Abb. 7. Oben: Densitogramm der mit Amidoschwarz angefärbten unlöslichen Mitochondrienproteine aus Wildtyp (-) und Mutante mi-1 (.....) von Neurospora nach gelelektrophoretischer Trennung. (Fortsetzung der Legende auf S. 21).

Unten: Verteilung der in vitro inkorporierten $^{14}\text{-C}$ -Aminosäuren auf die Fraktionen der oben gezeigten Pherogramme.

 Wildtyp; ... Mutante mi-1.

Die gesamte auf dem Gel wiedergefundene Radioaktivität (Wildtyp 8,000 Ipm; Mutante mi-1 1,000 Ipm) wurde gleich 100 gesetzt, und der Prozentgehalt der einzelnen Fraktionen berechnet.

Einbaubedingungen wie in Tab. 1.

Im Wildtyp enthält die Bande 4 13 % der eingebauten Radioaktivität und 4 % der Amidoschwarzfärbung. Die Radioaktivität ist hier also auf das 3fache angereichert. In der Mutante mi-1 entfallen auf diese Bande 4 % der Radioaktivität und 3 % der Amidoschwarzfärbung. Es ist keine Radioaktivität mehr in dieser Bande angereichert. Die Bande 4 im Wildtyp enthält also markiertes und unmarkiertes Protein, sie ist inhomogen.

Bezieht man die in der Mutante verschwundene Radioaktivität (9 %) auf das verschwundene Protein (1 %) (Abb. 8), so ergibt sich eine 9fache Anreicherung. Unter der Voraussetzung, daß alle in vitro markierten Proteine die gleiche spezifische Radioaktivität besitzen, würde das bedeuten, daß diese Proteine etwa 10 % der Membranproteine ausmachen, oder etwa 5 % des gesamten Mitochondrienproteins.

Abb. 8. Differenceprofile Wildtyp minus mi-1 abgeleitet aus den Pherogrammen in Abb. 7.

Es wurde für jede Fraktion die Differenz aufgetragen sowohl der Prozentgehalt an Amidoschwarzfärbung, als auch der Prozentgehalt an Radioaktivität.

Die Zahlen an der Amidoschwarzkurve bezeichnen die Positionen der einzelnen Banden. (Abb. auf S. 22)

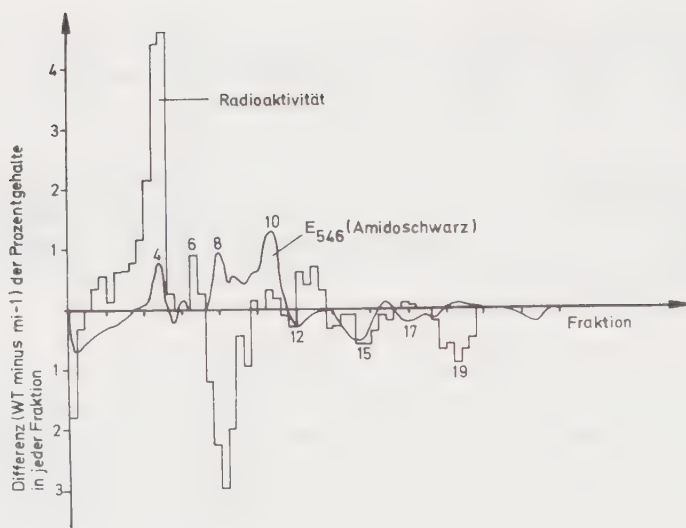


Abb. 18 (Legende auf S. 21)

3.2.4. Vergleich der in vitro Markierungsmuster von Neurospora-Wildtyp-, Rattenleber- und Heuschreckenflugmuskul-Mitochondrien

Für Rattenleber- und Locusten-Mitochondrien* sind die Bedingungen bekannt, unter denen in vitro Aminosäuren inkorporiert werden. Es war nun interessant, bei derart verschiedenen Organismen den Einbau in die einzelnen Banden des Elektrophoresemusters zu untersuchen und mit dem Markierungsmuster von Neurospora-Mitochondrien zu vergleichen (Abb. 9).

Die Locusten-Mitochondrien inkorporieren in die Banden 2, 4, 5, 6, 8 und 9, die Rattenlebermitochondrien in die Banden 4, 5, 6, 9a und 9b. Die drei Markierungsmuster haben einiges gemeinsam. Der Hauptteil der Radioaktivität befindet sich in den langsam wandernden Banden. Die höchste Markierung zeigt die

* Flugmuskel der afrikanischen Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*)

Bande 4, die sich in den drei Objekten nur geringfügig in der Wanderungsgeschwindigkeit unterscheidet. Ebenso ist die Bande 6 immer markiert.

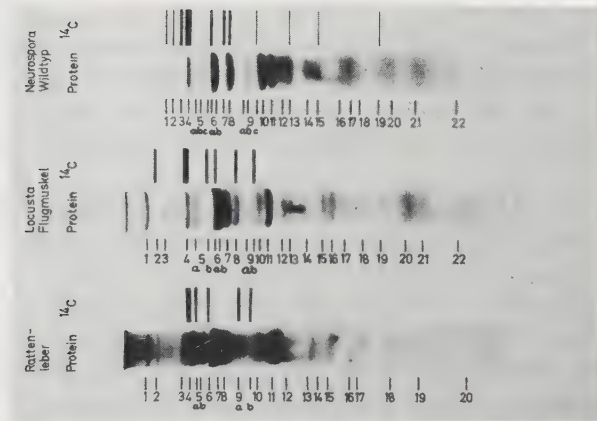


Abb. 9. Vergleich des in vitro Markierungsmusters von unlöslichem Mitochondrienprotein aus Neurospora Wildtyp, aus dem Heuschreckenflugmuskel und aus der Rattenleber.

Es sind die gleichen Pherogramme wie in Abb. 1. gezeigt. Die Markierung der Banden wurde den Versuchen entnommen, die in Abb. 6, 7 (Neurospora), Abb. 14 (Locusta) und in der Literatur (Neupert et al. 1968) (Rattenleber) dargestellt sind.

3.3. Untersuchungen zum mitochondrialen Aminosäureeinbau in vivo nach Hemmung der extramitochondrialen Proteinsynthese mit Cycloheximid.

Versuche mit Neurospora-Wildtyp und Heuschreckenflugmuskel

Für die Untersuchung des internen Aminosäureeinbaus der Mitochondrien ist es notwendig, die externe Proteinsynthese auszuschalten. Bei den bis jetzt gezeigten Versuchen wurde dies erreicht, indem die Mitochondrien isoliert von der ganzen Zelle untersucht wurden. In den folgenden Versuchen wird gezeigt, daß man das gleiche in vivo erreichen kann, wenn die extramitochondriale Proteinsynthese durch den Hemmstoff Cycloheximid spezifisch eliminiert wird. Damit ist es möglich, die Ergebnisse der in vitro-Experimente mit einer unabhängigen Methode in vivo zu vergleichen.

3.3.1. Wirkung von Cycloheximid auf den in vivo-Einbau von 14-C-Aminosäuren in cytosolische und mitochondriale Proteine

Die Versuche wurden mit der Wanderheuschrecke 2 Tage nach der Imaginalhäutung und mit Neurospora-Wildtyp durchgeführt. Sowohl der Heuschreckenflugmuskel als auch die Hyphen von Neurospora wachsen sehr rasch, mit Verdopplungszeiten von 2 Tagen (Brosemer et al., 1963) bzw. 4 Stunden. Dem entsprechend ergeben sich hohe Geschwindigkeiten der Proteinsynthese.

Nach der Markierung wurden die Zellen auf zwei Fraktionen aufgearbeitet. Es wurden die Mitochondrien isoliert, und als representatives Produkt der extramitochondrialen Proteinsynthese der Teil der Zelle der nach 30minütigem Zentrifugieren bei 20,000 x g im Überstand bleibt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Aminosäureeinbau in Abhängigkeit von der Cycloheximidkonzentration untersucht (Abb. 10,11). Der Hemmstoff wird bereits bei sehr geringen Konzentrationen wirksam. Während der Einbau in die Proteine des Überstands nahezu vollständig gehemmt ist, ist der

Einbau in die mitochondrialen Proteine zu 15 - 20 % nicht hemmbar.

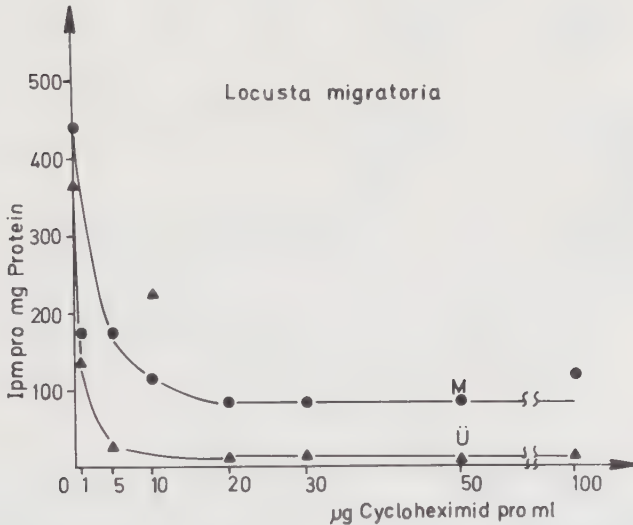


Abb. 10. In vivo-Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in das Protein von Mitochondrien (M, $\bullet - \bullet$) und 20,000 x g Überstand (Ü, $\blacktriangle - \blacktriangle$) aus dem Heuschreckenflugmuskul in Abhängigkeit von verschieden hohen Dosen Cycloheximid.

Für jeden Punkt in der Abbildung wurden 4 Insekten (2 männlich, 2 weiblich) aufgearbeitet. Es wurden $0,2 \mu\text{C}$ ^{14}C -Phenylalanin (u. 459 mC/mMol) pro Insekt gespritzt und nach 30 Min. Einbauzeit aufgearbeitet.

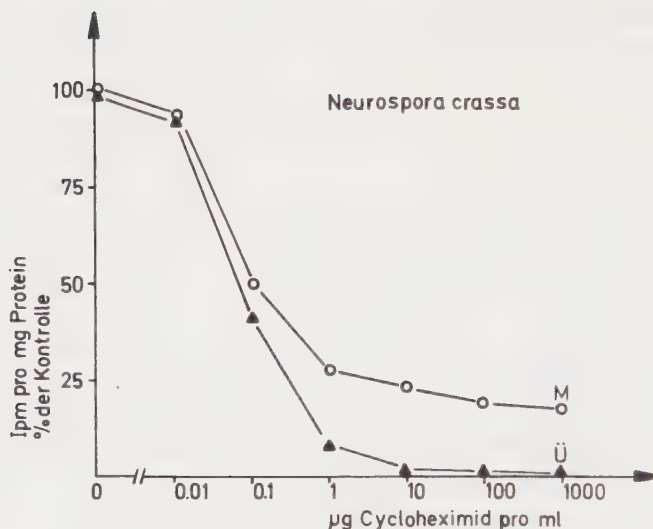


Abb. 11. In vivo-Einbau von ^{14}C -Leucin in das Protein von Mitochondrien (M, $\circ - \circ$) und 20,000 x g Überstand (Ü, $\blacktriangle - \blacktriangle$) aus Neurospora-Wildtyp unter der Wirkung verschieden hoher Konzentrationen an Cycloheximid. Die Werte sind bezogen auf die Kontrolle ohne Cycloheximid als 100 % (Mitochondrien 2,800 Ipm pro mg Protein; Überstand 5,000 Ipm pro mg Protein).

Für jeden Punkt in der Abbildung wurde eine 20 Std. alte 50 ml-Kultur verwendet. Es wurde 5 Min. mit Cycloheximid vorinkubiert. 0,5 μC ^{14}C -Leucin (u. 305 mC/mMol) wurden 10 Min. inkorporiert.

3.3.2. Verteilung der Cycloheximid-resistenten Markierung auf lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine

Im *Locusta*-Experiment wurde nach einer Einbauzeit von einer Stunde aufgearbeitet, also zu einer Zeit, wo die mitochondriale Proteinsynthese unter der Wirkung von Cycloheximid

nicht mehr arbeitet (siehe Abb. 15b). Im Neurospora-Experiment wurden nach einer Einbauzeit von 30 Min. die radioaktiven Aminosäuren durch Zugabe der entsprechenden unmarkierten Aminosäuren (2 mM) verdünnt und weitere 30 Min. nachinkubiert. Es befinden sich dann keine markierten unvollständigen Peptidketten mehr an den mitochondrialen Ribosomen (Neupert et al., 1969).

Unter diesen Bedingungen verteilt sich der Cycloheximid-resistente Einbau auf lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine, wie in Tab. 2 und 3 zusammengestellt.

Tab. 2. Verteilung von in vivo eingebauten ^{14}C -Aminosäuren auf lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine aus dem Heuschreckenflugmuskel mit und ohne Cycloheximid.

Mitochondrien- fraktionen	Spezifische Radioaktivität (Ipm pro mg Protein) nach der Markierung		
	<u>in vivo</u> ^{a)}	<u>in vivo</u> plus ^{b)} Cycloheximid	<u>in vitro</u> ^{c)}
unlösliche Proteine	9,200	3,650	11,000
lösliche Proteine	8,300	540	960

- a) 1 Std. mit $0,4\ \mu\text{C}$ Leucin (u. $311\ \text{mC/mMol}$), $0,4\ \mu\text{C}$ Iso-leucin (u. $308\ \text{mC/mMol}$) und $0,4\ \mu\text{C}$ Phenylalanin (u. $459\ \text{mC/mMol}$) pro Insekt.
- b) 1 Std. mit $2\ \mu\text{C}$ Leucin, $2\ \mu\text{C}$ Isoleucin und $2\ \mu\text{C}$ Phenylalanin pro Insekt, in der Gegenwart von $50\ \mu\text{g}$ Cycloheximid. Weitere $50\ \mu\text{g}$ wurden 30 Min. später nachinjiziert.
- c) 30 Min. mit $1\ \mu\text{C}$ Leucin, $1\ \mu\text{C}$ Isoleucin und $1\ \mu\text{C}$ Phenylalanin pro ml, in einem Brosert et al. (1966) beschriebenen Inkubationsmedium.

Tab. 3. Wirkung von Cycloheximid auf den in vivo-Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in mitochondriale Subfraktionen von Neurospora-Wildtyp.

Zellfraktionen	Spezifische Radioaktivität (Ipm pro mg Protein) nach der Markierung	
	<u>in vivo</u>	<u>in vivo</u> plus Cycloheximid
20,000 x g Überstand	130,000	3,000
ganze Mitochondrien	120,000	28,000
lösliche Mitochondrienproteine	105,000	3,100
unlösliche Mitochondrienproteine	140,000	60,000

22 Std. alte Hyphen in 10 50 ml-Kulturen wurden parallel 30 Min. mit 100 nC pro ml Leucin (u. 305 mC/mMol), 100 nC pro ml Isoleucin (u. 311 mC/mMol) und 100 nC pro ml Phenylalanin (u. 459 mC/mMol) markiert. Von den 10 Kulturen wurden 5 mit 100 μg Cycloheximid pro ml für 5 Min. vorinkubiert. Nach der Markierung wurden die Kulturen nach Zugabe von den entsprechenden unmarkierten Aminosäuren (2 mM) weitere 30 Min. inkubiert.

In beiden Objekten ist in der Kontrolle ohne Cycloheximid der Einbau in lösliche und unlösliche Mitochondrienproteine etwa gleich hoch. Unter der Wirkung von Cycloheximid werden die unlöslichen Proteine viel höher markiert als die löslichen. Wie im Neurospora-Experiment (Tab. 3) gezeigt, ist der Einbau in die löslichen Mitochondrienproteine im gleichen Ausmaß gehemmt wie der Einbau in die Proteine des 20,000 x g Überstandes. Der Cycloheximid-resistente Einbau findet ausschließlich in die unlöslichen Mitochondrienproteine statt. Dies bestätigt die Ergebnisse, die nach dem in vitro-Einbau erhalten werden (Tab. 1.).

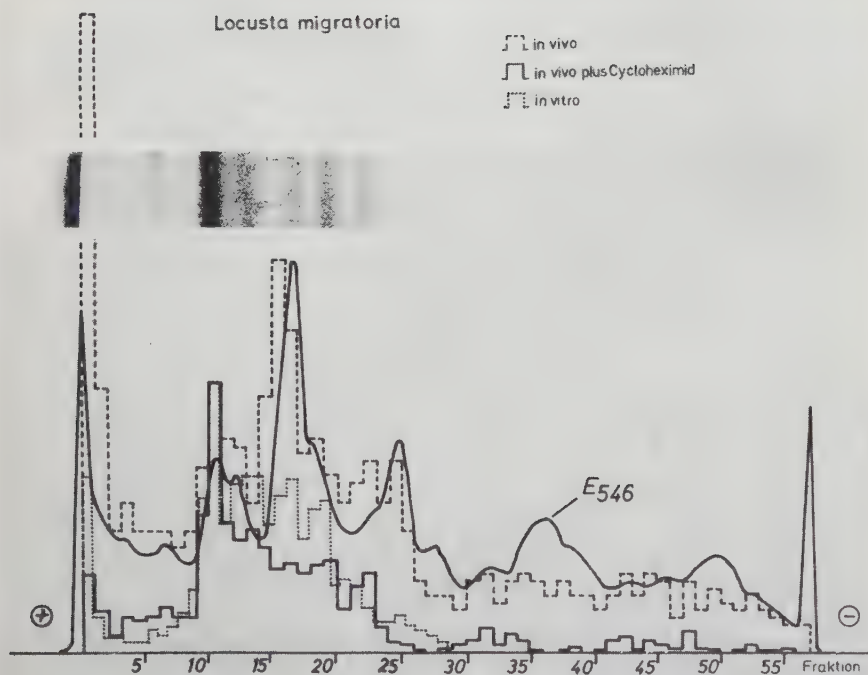


Abb. 12 (Legende auf S. 30)

3.3.3. Verteilung der in vivo eingebauten ¹⁴C-Aminosäuren auf die Banden der elektrophoretisch aufgetrennten unlöslichen Mitochondrienproteine

Die in Tab. 2 und 3 beschriebenen unlöslichen Mitochondrienproteine wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität in den Pherogrammen bestimmt.

In der Kontrolle (in vivo ohne Cycloheximid) sind alle Banden ungefähr proportional zur Amidoschwarzfärbung markiert (Abb. 12 und 13). Unter der Wirkung von Cycloheximid werden nur noch einige Banden markiert. Von den Mitochondrien aus dem Flugmuskel werden die Aminosäuren in die Banden 2, 4, 5b, 6, 8 und 9 eingebaut (Abb. 12). Mitochondrien von Neurospora inkorporieren in die Banden 2, 3, 4, 6, 8 und 9c. Die meiste Radioaktivität enthält in beiden Objekten die Bande 4.

Das Markierungsmuster ist nahezu identisch mit dem Muster, das nach der in vitro-Markierung erhalten wird (Abb. 12 und 14). Unterschiedlich ist die relativ höhere Markierung der Bande 4 bei dem in vivo-Einbau unter Cycloheximid-Wirkung.

Abb. 12. Densitogramm von unlöslichem Mitochondrienprotein aus dem Heuschreckenflugmuskel nach gelelektrophoretischer Trennung und Anfärbung mit Amidoschwarz (durchgezogene Kurve, E₅₄₆), und die Verteilung der Radioaktivität über die Pherogramme (Treppenlinien) nach ¹⁴C-Aminosäureneinbau in vivo (), in vivo plus Cycloheximid () und in vitro (). Die Radioaktivität in der Bande 4 wurde auf gleiche Höhe gesetzt.

Die unlöslichen Mitochondrienproteine wurden markiert wie in Tab. 2 beschrieben.

Oben ist in der Größe zum Densitogramm passend die Autoradiographie nach der Markierung in vivo plus Cycloheximid eingefügt. (Abb. siehe S. 29)

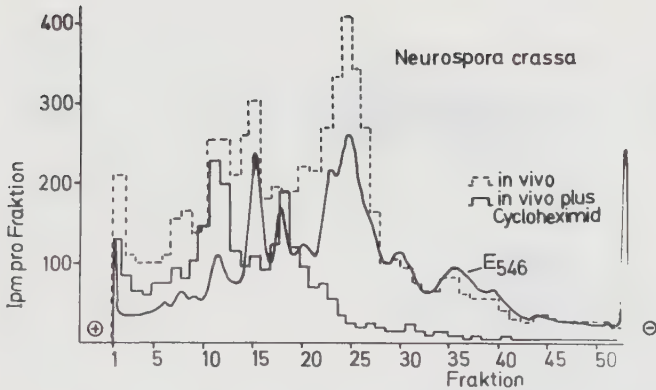


Abb. 13. Densitogramm von unlöslichem Mitochondrienprotein aus Neurospora-Wildtyp nach gelelektrophoretischer Trennung und Anfärbung mit Amidoschwarz (durchgezogene Kurve, E₅₄₆) und Verteilung der Radioaktivität über die Pherogramme (Treppenlinien) nach ¹⁴C-Aminosäureeinbau in vivo (---) und in vivo plus Cycloheximid (—). Die Proteine wurden markiert wie in Tabelle 3 beschrieben.

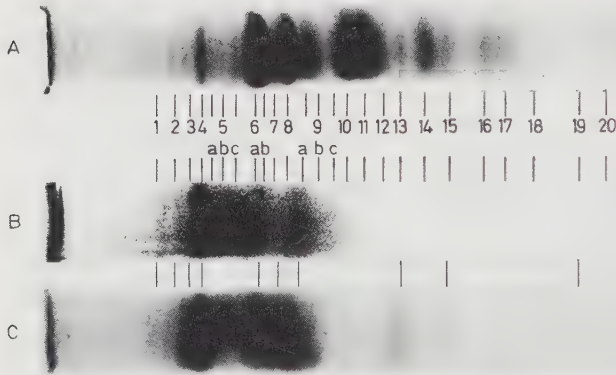


Abb. 14. A: Bandenmuster von unlöslichem Mitochondrienprotein von Neurospora-Wildtyp.

B: Autoradiographie nach ^{14}C -Aminosäureneinbau in vivo plus Cycloheximid.

C: Autoradiographie nach ^{14}C -Aminosäureneinbau in vitro.

3.3.4. Wirkung von Cycloheximid auf den mitochondrialen Aminosäureeinbau in vivo.

Die in vivo-Markierungsrate der mitochondrialen Proteine hängt von der Dauer der Cycloheximid-Einwirkung ab. Im *Locusta*-Experiment (Abb. 15A,B) wurde die Zeitabhängigkeit des 14 -C-Aminosäureeinbaus in die mitochondrialen Proteine unter der Wirkung von Cycloheximid bestimmt. Der Einbau nahm in den ersten 30 Min. etwa linear zu und betrug 15 % der Kontrolle ohne Cycloheximid. Ab 50 Min. wurde kein Einbau mehr gemessen. Der Einbau in die Proteine des Überstands war über den beobachteten Zeitraum gleich Null.

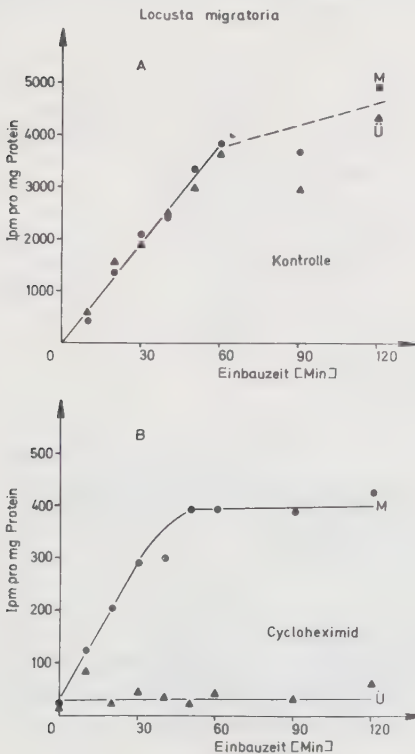


Abb. 15A,B. Zeitverlauf des in vivo-Einbaus von 14 -C-Aminosäuren in das Protein von Mitochondrien (M, ● - ●) und 20,000 x g Überstand (U, ▲ - ▲) aus dem Heuschreckenflug-muskel.

A) nach der Injektion von 0,2 μ C Leucin (u. 311 mC/mMol), 0,2 μ C Isoleucin (u. 308 mC/mMol) und 0,2 μ C Phenylalanin (u. 459 mC/mMol) pro Insekt.

B) Gleichzeitig mit den unter A) genannten Aminosäuren wurde 50 μ g Cycloheximid pro Insekt gespritzt. Der Hemmstoff wurde alle 30 Min. in gleicher Menge nachgespritzt.

Im Neurospora-Experiment wurde eine andere Versuchsanordnung gewählt. Die Hyphen wurden verschiedene Zeiten mit Cycloheximid vorinkubiert, und dann jedesmal der Einbau während 10 Min. bestimmt. Es zeigte sich (Abb. 16), daß der Einbau in die mitochondrialen Proteine mit der Zeit der Cycloheximid-Vorinkubation abnimmt. Nach einer Stunde war nur noch ein geringer, nach 4 Stunden überhaupt kein Einbau mehr meßbar.

Der Einbau von 14 -C-Aminosäuren sagt allein noch nichts über die Geschwindigkeit der Proteinsynthese aus, denn die Größe und Änderung des endogenen Aminosäuren-Pools ist unbekannt. Die Versuche in Abb. 15 und 16 zeigen jedoch, daß im Flugmuskel der Heuschrecke etwa 45 Min. und bei Neurospora über 60 Min. nach der Zugabe von Cycloheximid noch eine mitochondriale Proteinsynthese vorhanden ist.

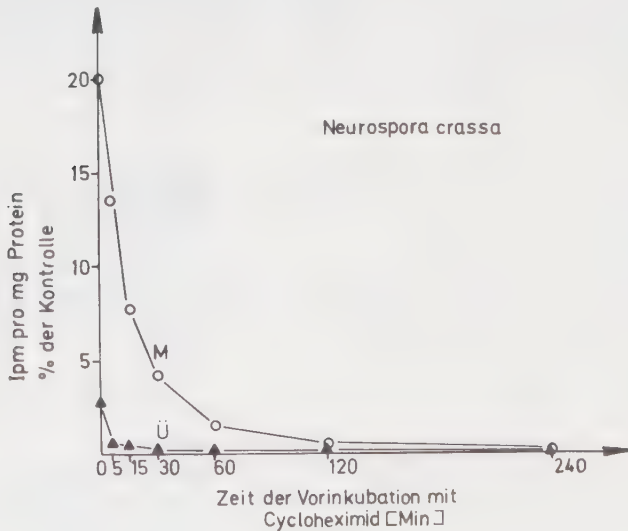


Abb. 16. In vivo-Einbau von 14 -C-Leucin in das Protein von Mitochondrien (M, O - O) und 20,000 x g Überstand (Ü, ▲ - ▲) aus Neurospora-Wildtyp in Abhängigkeit von der Cycloheximid-Vorinkubation. Die Werte sind bezogen auf eine Kontrolle

ohne Cycloheximid als 100 % (Mitochondrien **3100** Ipm pro mg Protein; Überstand 6950 Ipm pro mg Protein).

20 Stunden alte Hyphen wurden mit 100 µg Cycloheximid pro ml Kulturmedium vorinkubiert. 10 nC Leucin (u. 305 mC/mMol) pro ml wurden 10 Min. lang eingebaut.

Werden Mitochondrien aus Hyphen isoliert, die so lange mit Cycloheximid vorinkubiert worden sind, daß in vivo kein Aminosäureneinbau mehr meßbar ist, so inkorporieren diese noch in vitro (Abb. 17). D. h. das System des mitochondrialen Aminosäureneinbaus wird durch das Antibiotikum in vivo nicht irreversibel geschädigt.

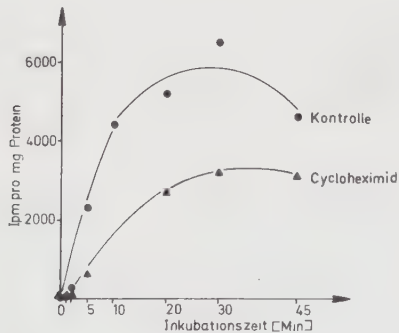


Abb. 17. In vitro-Einbau von ^{14}C -Leucin in Mitochondrien von Neurospora-Wildtyp.

Kontrolle: Die Mitochondrien wurden aus unbehandelten Hyphen isoliert.

Cycloheximid: Die Mitochondrien wurden aus Hyphen isoliert, die zuvor 4 Stunden mit 5 µg Cycloheximid pro ml vorinkubiert worden waren. (Wird mit 100 µg Cycloheximid pro ml vorinkubiert, ergeben sich ähnliche Ergebnisse.)

4. Experimenteller Teil

4.1. Gelelektrophorese

Das 7,5 %-ige Polyacrylamidgel wurde aus den folgenden Stammlösungen polymerisiert:

1.) Acrylamid	30 g	2.) Ammoniumper-	
Bisacrylamid	0,8 g	oxodisulfat	0,5 g
Tetramethyl-		Wasser ad	100 ml
äthylendiamin	0,5 ml		
Wasser ad	300 ml		

Die beiden Lösungen wurden im Verhältnis 3:1 gemischt und dann in Kunststoffformen von den Dimensionen 0,2 x 5 x 15 cm gegossen. Das Gel ist nach etwa 10 Min. polymerisiert. Die Gelplatten wurden über Nacht gewässert und dann 2 mal 24 Std. in Phenolmedium geschüttelt, wobei sie etwas quollen. Das Phenolmedium setzte sich zusammen aus Phenol, Ameisensäure und Wasser im Verhältnis 2:1:1 (Gewicht:Volumen:Volumen).

Für die Elektrophorese wurden die Gelplatten gut zwischen Filterpapier getrocknet und spannungsfrei auf eine Glasplatte gebracht. In das Gel wurde mit einer Rasierklinge ein etwa 1-2 cm langer und 0,5 mm breiter Spalt geschnitten, in den die Probe mit einer Mikro-Kolbenpipette aufgetragen wurde. Als Pipettenspitze wurde ein fein ausgezogener Polyäthylenschlauch verwendet. Das zu trennende Protein wurde in einer Konzentration von 10 mg pro ml in dem Phenolmedium gelöst. Das Gel wurde über dicke Filterpapierbrücken mit den Elektrodenpuffern (10 %ige Essigsäure) verbunden. Nachdem alles Protein bei einer Feldstärke von 3,5 Volt pro cm in das Gel eingewandert war (nach einer Stunde), wurde das Gel einschließlich Auftragsspalt mit einer Polyäthylfolie abgedeckt, und die Spannung auf 7 Volt pro cm erhöht. Die gesamte Laufzeit war 6-7 Stunden.

Angefärbt wurde eine Stunde mit Amidoschwarzlösung (550 mg Amidoschwarz in 100 ml 7 %iger Essigsäure). Entfärbt wurde mit 10 %iger Essigsäure.

Zum Densitometrieren der gefärbten Banden wurden die Pherogramme ausgeschnitten und zwischen zwei Objektträgern auf einen Schlitten geklemmt. Dieser wurde von einem Synchronmotor (1,9 cm Vorschub pro Min.) durch den Lichtweg eines Eppendorf-Photometers geschoben. Der Lichtweg wurde auf der Seite des Photomultipliers von einer punktförmigen Blende begrenzt ($\varnothing$ 0,1 mm). Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 546 m μ . Die Extinktion wurde auf einem Schreiber mit einem Vorschub von 10 cm pro Min. registriert. Als Nulllinie wurde die Extinktion des leeren Gels geschrieben.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilungen in den Gelen wurden diese parallel zu den angefärbten Banden in etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Das Gel wurde dazu gegen einen Anschlag geschoben, dem parallel in definiertem Abstand eine Rasierklinge geführt werden konnte. Die so erhaltenen Schnitte wurden mit 1 ml Ameisensäure in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert, das Gefäß mit 0,5 ml Ameisensäure nachgewaschen, alles auf einem Aluminiumplättchen eingetrocknet und in einem fensterlosen Methandurchflußzähler von Fricke & Höpfner die radioaktiven Zerfälle gemessen. Durch das Homogenisieren und die Selbstabsorption des Gels gehen etwa 25 % der zur Elektrophorese eingesetzten Radioaktivität verloren.

Zur Autoradiographie wurden die Gele derart eingetrocknet, daß sie nur in der Dicke schrumpfen konnten. Dies wurde erreicht, indem die Gele zwischen Filterpapier und eine Plastikfolie gelegt und mit dem Filterpapier nach oben unter einer Infrarot-Lampe getrocknet wurden, bis der Geruch nach Essigsäure verschwunden war. Das getrocknete Gel wurde auf einem Röntgenfilm (Osray D-X) befestigt und zwischen zwei Holzplatten zusammengepreßt im Dunklen gelassen.

4.2. Kultur von Heuschrecken und Neurospora

Die Heuschrecken (Locusta migratoria) wurden vom Anti-Locust Research Centre, London, geliefert. Sie wurden nach den Angaben von Hunter - Jones gezüchtet.

Wildtyp 74 A von Neurospora crassa wurde von W. Klingmüller (Genetisches Institut der Universität München) zur Verfügung gestellt. Die cytoplasmatischen Mutanten mi-1 und mi-3 wurden vom Fungal Genetics Stock Centre (FGSC, Department of Biological Sciences, Dartmouth College, Hannover, New Hampshire, U.S.A.) erhalten.

Größere Mengen von Conidien wurden auf Agarböden mit Glycerin-Vollmedium in 300 ml Weithals-Erlenmeyer gezogen. Die Kolben wurden dazu mit Conidien beimpft, mit Schaumstoff abgedeckt und bei 25° C bebrütet (Wildtyp 7 Tage, Mutanten 10 Tage). Die gebildeten Conidien wurden mit einer Impföse ausgekratzt und in Wasser aufgenommen. Die noch mit Hyphen verunreinigte Suspension wurde zum Zerschlagen von Klumpen mit einem Magnetrührer gerührt und dann durch Watte filtriert. Die Conidien wurden dann ausgezählt und die Suspension mit Wasser auf einen Titer von 10^8 Conidien pro ml verdünnt. Alle Operationen wurden mit sterilen Geräten unter sterilen Bedingungen durchgeführt ! Vom Wildtyp erhält man pro Kolben gewöhnlich 15 - 20 x 10^8 Conidien, von den Mutanten mi-1 und mi-3 1 - 4 x 10^8 .

Die Hyphen wurden in Vogels Minimalmedium gezüchtet. In 200 ml Enghals-Erlenmeyer wurden jeweils 50 ml Medium mit 10^8 Conidien beimpft. Die Kolben wurden bei 25° C geschüttelt. Der Wildtyp wurde nach 18 - 24 Std. geerntet, die Mutante mi-1 nach 72 Stunden und die Mutante mi-3 nach 48 Std. Die Ausbeute war ungefähr 1 g Feuchtgewicht pro 50 ml Medium.

Glycerin-Vollmedium

Vogels Medium (50-fach konzentriert)	20 ml pro Ltr.
Glycerin	10 ml pro Ltr.
Saccharose	10 g pro Ltr.
Vitaminlösung	10 ml pro Ltr.
Hefeextrakt	2,5 g pro Ltr.
Kaseinhydrolysat	1 g pro Ltr.
Agar	15 - 20 g pro Ltr.

Vogels Minimalmedium

Vogels Medium (50-fach konzentriert)	20 ml pro Ltr.
50 %ige Saccharose- lösung	40 ml pro Ltr.

Vogels Medium (50-fach konzentriert)

in 750 ml destilliertem Wasser werden nacheinander bei Zimmertemperatur unter Rühren die folgenden Substanzen gelöst:

$\text{Na}_3 \text{ zitrat} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	150 g	
KH_2PO_4 wasserfrei	250 g	
NH_4NO_3 wasserfrei	100 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 g	pH etwa 5,8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	5 g	
Lösung von Spurenelementen	5 ml	
Biotinlösung	2,5 ml	

Biotinlösung

5,0 mg Biotin werden in 50 ml 50 %igem Äthanol gelöst.

Lösung von Spurenelementen

In 95 ml destilliertem Wasser werden nacheinander bei Zimmertemperatur unter Rühren die folgenden Substanzen gelöst.

Zitronensäure · H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ · 1 H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃ wasserfrei	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,05 g

Vitaminlösung

In einem Liter destilliertem Wasser werden gelöst

Vitamin B ₁ (Thiamin)	10 mg
Vitamin B ₂ (Laktoflavin)	5 mg
Vitamin B ₆ (Pyridoxin)	5 mg
p-Amino-Benzoesäure	5 mg
Nikotinsäureamid	5 mg
Cholin-Hydrochlorid	100 mg
Folsäure	1 mg
Inositol	100 mg
Kalzium-Pantothenat	50 mg

4.3. Isolierung von Mitochondrien, Präparation der unlöslichen Mitochondrienproteine und der Zellsaftproteine

Aus den Hyphen von *Neurospora* wurden die Mitochondrien nach verschiedenen Verfahren isoliert.

1.) Die Hyphen (etwa 10 g Feuchtgewicht) wurden auf einer Nutsche abgesaugt, mit 0,63 M Sorbitol gewaschen, in 100 ml Helicasemedium (0,63 M Sorbitol; 0,1 M Zitronensäure; 30 mM Cysteaminhydrochlorid; 0,4 mM EDTA; 250 mg pro 100 ml Helicase; mit K_2HPO_4 auf pH 5,8 gebracht) eine Stunde bei 30° C inkubiert, abzentrifugiert und einmal mit 0,9 M Sorbitol gewaschen. Die gewaschenen Hyphen wurden in Saccharosemedium (0,25 M Saccharose; 5 mM EDTA; 0,15 % Serumalbumin; pH 7,0) resuspendiert und in einem Glas-Teflon-Potter-Elvehjem-Homogenisator aufgeschlossen (Teflonstempel 7 mal auf und ab).

Das Homogenat wurde 10 Min. bei 1,500 x g zentrifugiert, der Überstand ein zweites Mal 10 Min. bei 1,500 x g, die Mitochondrien wurden durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 8,000 x g sedimentiert. Das Mitochondrienpellet wurde resuspendiert und die Suspension 10 Min. bei 1,500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 30 Min. bei 8,000 x g zentrifugiert. Das entstandene Mitochondrienpellet wurde für die Versuche verwendet. (Greenawalt et al., 1967)

2.) Die Hyphen wurden auf einer Nutsche abgesaugt, zuerst mit Wasser und dann mit Saccharosemedium gewaschen (0,44 M Saccharose; 1 mM EDTA; pH 7,0), mit Sand vermischt (der Hälfte des Feuchtgewichtes) und mit der doppelten Menge Saccharosemedium (Volumen pro Feuchtgewicht) in einem Mörser 5 Min. gerieben. Dann wurde noch einmal die dreifache Menge an Saccharosemedium (Volumen pro Feuchtgewicht) zugefügt und weitere 5 Min. gerieben. Die Suspension wurde durch ein Tuch abgepreßt und der Rückstand noch einmal wie oben zerrieben. Die vereinigten Filtrate wurden wie unter 1.) angegeben zentrifugiert (Luck, 1963).

3.) Die Hyphen wurden auf einer Nutsche abgesaugt, zuerst mit Wasser und dann mit Saccharosemedium (0,44 M Saccharose; 1 mM EDTA; pH 7,0) gewaschen, in der 10fachen Menge Saccharosemedium aufgeschwemmt (Volumen pro Feuchtgewicht) und im Starmix oder mit dem Ultraturraxstab 1 Min. homogenisiert. Der Brei wurde anschließend in einer Mühle zwischen zwei sich gegeneinander drehenden Korundscheiben zermahlen (Weiß, 1969). Das Homogenat wurde zentrifugiert wie unter 1.) angegeben.

Die Mitochondrien aus dem Flugmuskel der Wanderheuschrecke wurden nach der Vorschrift von Klingenberg et al. (1959) isoliert, die Mitochondrien aus der Rattenleber nach der Vorschrift von Schneider et al. (1948).

Zur Extraktion der löslichen Proteine und der Lipide wurden die Mitochondrien in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 resuspendiert (1-2 pro ml) und unter Eiskühlung 4 mal 15 Sek. mit Ultraschall behandelt (Stufe 6) mit einer je einminütigen Pause. Dann wurde 1 Std. bei 100,000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde ein zweites Mal in Phosphatpuffer resuspendiert, beschallt und zentrifugiert. Beim dritten Mal wurde in 1 mM EDTA resuspendiert und dann auf gleiche Weise beschallt und zentrifugiert. Die sedimentierten Membranen wurden einmal mit eiskaltem Aceton, einmal mit eiskaltem Chloroform/Methanol (2:1, Volumen:Volumen) und noch einmal mit Aceton extrahiert. Dann wurde das Protein an der Luft getrocknet.

Als 20,000 x g-Überstand wurde der Teil des Homogenats isoliert, der nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 20,000 x g im Überstand bleibt. Er enthält Zellsaft und Ribosomenproteine.

4.4. In vitro-Einbau von ^{14}C -Aminosäuren

Das gewaschene Mitochondrienpellet wurde in Saccharosemedium aufgenommen (20 mg pro ml). Von der Suspension wurden jeweils 50 μl zu 950 μl Inkubationsmedium pipettiert, das in 10 ml Zentrifugenbechern (Spinco) vorbereitet worden war. Die 1 ml-Proben wurden bei 30°C in einem thermostatisierten Wasserbad geschüttelt.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Proben in kleine Zentrifugenbecher (1,7 ml; Nethler & Hinz) überführt, mit 0,1 ml gesättigter Lösung derjenigen Aminosäuren versetzt, die radioaktiv im Inkubationsmedium vorhanden waren. Die Proteine wurden anschließend mit 0,5 ml 16 %iger Trichloressigsäure ausgefällt und mehrmals gewaschen, wie von Neupert (1967) beschrieben.

Sollte nur das markierte unlösliche Mitochondrienprotein isoliert werden, so wurden die Proben nach der Inkubation direkt in eiskaltes Saccharosemedium geschüttet, das 2 mM diejenigen Aminosäuren enthielt, die zur Markierung verwendet worden waren. Die abzentrifugierten Mitochondrien wurden noch zweimal mit diesem Medium gewaschen und dann weiterverarbeitet.

4.5. In vivo-Einbau von ^{14}C -Aminosäuren

4.5.1. Versuche mit Heuschrecken

Für die Versuche wurden durchweg 12 Std. gehungerte Heuschrecken 2 Tage nach der Imaginalhäutung verwendet, und zwar gleichviel weibliche und männliche Insekten. Die ^{14}C -Aminosäuren und Cycloheximid wurden in Insektenringer (NaCl 0,9 %; KCl 0,02 %; CaCl_2 0,02 %) gelöst. Die Lösung wurde den Insekten mit einer Präzisions-Injektionsspritze mit Mikrometerantrieb abdominal injiziert. Es wurden 20 μl appliziert, zuerst das Cycloheximid und unmittelbar darauf die ^{14}C -Aminosäuren. Der Muskel wurde wie gewöhnlich auf die verschiedenen Zell-

fraktionen aufgearbeitet, mit der Ausnahme, daß das Saccharosedium 10 mM diejenigen Aminosäuren enthielt, die zur Markierung verwendet worden waren.

4.5.2. Versuche mit Neurospora

Die 14-C-Aminosäuren, Cycloheximid und, wenn angegeben, die unmarkierten Aminosäuren wurden in Vogels Minimalmedium gelöst und zu den in den Versuchsbedingungen angegebenen Zeiten direkt in die Kulturen pipettiert. Der Einbau wurde beendet, indem die Hyphen auf einer eiskalten Nutsche abgesaugt und zuerst mit eiskaltem Wasser und dann mit eiskaltem Saccharosedium plus unmarkierten Aminosäuren (10 mM) gewaschen wurden. Die Hyphen wurden auf die einzelnen Zellfraktionen aufgearbeitet, wie oben angegeben.

4.6. Bestimmungsmethoden

Protein wurde nach der Biuretmethode in der Modifikation von Beisenherz et al. (1953) bestimmt.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die gewaschenen Proteinproben in 1 ml Ameisensäure gelöst und auf ein Aluminiumplättchen gegossen. Der Zentrifugenbecher wurde mit 0,5 ml Ameisensäure nachgewaschen und die Ameisensäure unter einer Infrarot-Lampe weggedampft. Die trockenen Plättchen wurden im Methandurchflußzähler (Frieske & Höpfner) mit einer Ausbeute von ca. 50 % gezählt.

4.7. Materialien

14-C-Aminosäuren: Radiochemical Centre, Amersham.

Helicase (Préparation sélectionnée et lyophilisée de suc d'Helix Pomatia): Industrie Biologique Française S.A. Gennevilliers (Seine).

Cycloheximid, Puromycin: Sigma Chemical Company, St. Louis.

ATP: Boehringer, Mannheim.

Chloramphenicol, D (-) threo: Bayer, Leverkusen.

Acrylamid, Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, Pyridoxal-HCl: Serva GmbH, Heidelberg.

12-C-Aminosäuren, Cysteaminhydrochlorid: Fluka GmbH, Buchs.

Agar, Hefeextrakt: Difco, Detroit.

Saccharose (Ampullenqualität), Phenol (lose Kristalle, redestilliert), Amido-Schwarz 10B, Nikotinsäureamid, Thiaminiumdichlorid, Riboflavin, Kalziumpantothenat, Biotin, Folsäure, p-Aminobenzoessäure, Cholinhydrochlorid, Inositol, Lösungsmittel (p.A.) und Salze (p.A.): Merck AG., Darmstadt.

OSRAY D-W Röntgenfilm: Agfa-Gevaert, München.

4.8. Apparate

Methan-Durchflußzähler FH 47: Fa. Friesseke & Hoepfner.

Ultrazentrifuge Spinco L2: Fa. Beckman Instruments.

Kühlzentrifuge Sorvall RC-2B: Fa. I. Sorvall.

Photometer Eppendorf mit Schreiber: Fa. Netheler und Hinz.

Sonifier S 75: Fa. Branson.

Ultraturrax TP 18/2: Fa. Jahnke & Kunkel.

5. Diskussion

5.1. Bedeutet der mitochondriale Aminosäureneinbau eine mitochondriale Proteinsynthese ?

Dafür gibt es viele Hinweise. In den Mitochondrien sind die zur Proteinsynthese nötigen Enzyme und Substrate gefunden worden (Roodyn et al., 1968). Der mitochondriale Aminosäureneinbau in vitro ist durch Hemmstoffe der Proteinsynthese wie z.B. Puromycin und Chloramphenicol vollständig hemmbar. (Kroon, 1953; Wheeldon et al., 1966; Neupert, 1967). Nach dem in vitro-Einbau von $^{14}\text{-C}$ -Aminosäuren wird ein Teil der Radioaktivität an den mitochondrialen Ribosomen gefunden (Küntzel et al., 1967). Diese Radioaktivität ist durch Puromycin ablösbar (Neupert et al., 1969). Es handelt sich also um unfertige Peptidketten. Es ist für viele verschiedene Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Lysin, Valin) bekannt, daß sie in vitro von Mitochondrien eingebaut werden (Roodyn, 1962; Wheeldon et al., 1966; Neupert, 1967). Die in vitro eingebauten Aminosäuren werden nicht als Endgruppen gefunden. (Neupert, 1967). Ist in vitro $^{14}\text{-C}$ -Phenylalanin inkorporiert worden, so ist nach einer Spaltung der Mitochondrienproteine mit Chymotrypsin mehr $^{14}\text{-C}$ -Phenylalanin als Endgruppe nachweisbar, als vor der Spaltung (Wintersberger, 1965). Die Aminosäure ist als in das Innere von Peptidketten integriert worden.

Der letzte Beweis für die Proteinnatur des Produktes steht noch aus, nämlich die Isolierung eines homogen markierten Proteins.

5.2. Zahl, Größe und Menge der mitochondrial synthetisierten Proteine

Bei den Mitochondrien aus Neurospora-Wildtyp sind im Markierungsmuster nach $^{14}\text{-C}$ -Aminosäureneinbau in vitro 5 elektrophoretische Banden stark markiert und weitere 6 schwach, bei-

nahe an der Nachweisgrenze. Daraus kann man nicht ohne weiteres schließen, daß 11 verschiedene Proteine oder Peptidketten synthetisiert worden sind.

Die Gelelektrophorese ist eine hochauflösende Methode. Dennoch ist es bei der großen Zahl von strukturgebundenen Mitochondrienproteinen (allein die mitochondrialen Ribosomen enthalten mindestens 30 verschiedene Proteine, Küntzel, 1969) wahrscheinlich, daß die einzelnen Banden mehrere verschiedene Proteine oder Peptidketten beinhalten, d.h. daß die markierten Fraktionen komplex sind.

Andererseits ist es möglich, daß noch nicht fertig synthetisierte oder bereits wieder abgebaute Peptidketten erfaßt werden. Besonders die schwachen Markierungen in einzelnen Banden könnten so zustande gekommen sein.

Ebenfalls auf eine zu große Zahl von synthetisierten Peptidketten würde man schließen, wenn ein markiertes Protein in mehreren Banden auftreten würde. So aggregiert z.B. Cytochrom c auf der beschriebenen Elektrophorese, und es wird eine Heterogenität vorgetäuscht. Diese Aggregate bilden jedoch ein typisches Muster. Das am meisten vorhandene Monomere wandert am raschesten, die immer seltener werdenden höheren Aggregate immer langsamer. Die markierten Proteine in den Banden 1, 2 und 3 könnten derartige Aggregate des markierten Proteins in der Bande 4 sein.

Außerdem könnten die markierten Proteine Komplexe mit anderen Proteinen bilden. Diese Komplexe müßten jedoch sehr spezifisch sein, da die Markierung nur in bestimmten Banden auftritt, und die Markierungsmuster in verschiedenen Organismen auffällige Ähnlichkeiten zeigen. Die Bildung von spezifischen Komplexen ist in dem extrem denaturierenden und solubilisierenden Phenolmedium (pH 1,5 - 2) jedoch schwer vorstellbar.

Mit diesen Vorbehalten würde das Markierungsmuster von Neurospora-Wildtyp so zu interpretieren sein, daß von den Mitochondrien in vitro mindestens 4 verschiedene Peptidketten synthetisiert worden sind.

Die markierten Proteine wandern auf der Gelelektrophorese langsam. Für die Membranproteine aus Chloroplasten wurde gezeigt (Bauer, 1968), daß die Gelelektrophorese hauptsächlich nach der Größe fraktioniert, da in dem stark sauren Phenolmedium Ladungsunterschiede ausgeglichen werden. Außerdem konnten wir zeigen, daß auf einer Molekularsieb-Chromatographie an Biogel-300 in dem gleichen Phenolmedium die markierten Proteine als erste aus der Säule eluiert werden. Sie gehören also zu den größten Proteinen der Mitochondrienmembran, vorausgesetzt, daß sie vollständig dissaggregiert sind. Das Molekulargewicht ist sicher kleiner als 300,000, da das 7,5 %ige Gel größere Teilchen ausschließt (siehe Maurer, 1968). Diese Molekulargewichtsangabe gilt für kugelförmige Proteine. Da die Proteine in dem Phenolmedium denaturiert sind und wahrscheinlich gestreckte Ketten bilden, können die Molekulargewichte möglicherweise um beinahe eine Größenordnung kleiner sein.

Im Abschnitt 3.2.3. (Abb. 8) wurde versucht, den Anteil des mitochondrial synthetisierten Proteins am gesamten Mitochondrienprotein abzuschätzen. Die Abschätzung geht von mehreren Voraussetzungen aus. Die Anfärbung mit Amidoschwarz wurde als Maß für die Proteinmenge genommen. Die Affinität für den Farbstoff kann jedoch bei verschiedenen Proteinen verschieden sein (siehe Maurer, 1968). Sowohl im Wildtyp als auch in der mi-1-Mutante wurde in den Pherogrammen die ganze Radioaktivität und das gesamte Protein gleich 100 % gesetzt. Beim Protein ist das berechtigt, da der Unterschied zwischen den beiden Mitochondrienarten klein ist. Im Falle der Radioaktivität ist der Unterschied jedoch groß, da in den mi-1-Mitochondrien eine große radioaktive Fraktion fehlt. Der errechnete Anteil von 5 % mitochondrial synthetisiertem Protein am gesamten Mitochondrienprotein ist also ein Maximalwert. Weiter wurde angenommen, daß alle mitochondrial synthetisierten Proteine mit der gleichen Geschwindigkeit gebildet werden. Dies erscheint berechtigt, da Mitochondrien mit konstanten Proportionen ihrer Enzymausstattung wachsen

(Brosmer et al., 1963), und in vivo alle elektrophoretischen Fraktionen etwa gleich stark markiert werden (Abb. 12 und 13).

Über die Cycloheximid-resistente Proteinsynthese in vivo wurde mit einer unabhängigen Methode ein vergleichbarer Wert von 8 % mitochondrial synthetisiertem Protein am gesamten Mitochondrienprotein gefunden. Dies wird weiter unten diskutiert.

5.3. Änderungen des Markierungsmusters in den Mitochondrien aus der mi-1-Mutante von Neurospora

Das Markierungsmuster in den Mitochondrien der Mutante mi-1 ist verändert. Die starke Radioaktivitätsbande, die in Position der Bande 8 auftritt, ist breiter als die entsprechende Proteinbande. Sie wird aber selbst von der Autoradiographie nicht weiter aufgelöst. Wie beim Wildtyp werden weiter geringe Radioaktivitäten in den Banden 9c, 13, 15 und 19 gefunden. Zusätzlich tritt Radioaktivität in der Bande 5c auf. Diese wird jedoch möglicherweise im Wildtyp von der Bande 4 verdeckt.

Wie in der Autoradiographie ganz deutlich zu sehen, sind die Radioaktivitäten in den Banden 1, 2, 3 und 4 vollständig verschwunden und die in der Bande 6 zumindest vermindert. Für dieses experimentelle Ergebnis gibt es mehrere Möglichkeiten der Erklärung. Die aus der Bande 4 verschwundenen markierten Proteine könnten an anderen Stellen des Pherogramms erscheinen. Sie müßten dann entweder zusammen mit der Bande 8 laufen oder aber sich diffus über den Untergrund verteilen. Andererseits ist es denkbar, daß die im Wildtyp markierten Proteine in den Banden 4 und 6 in der mi-1-Mutante nicht mehr gebildet werden.

Der experimentelle Befund läßt sich aber wohl kaum mit dem Austausch einer Aminosäure (Tryptophan gegen Cystein) erklären, wie er für das "Strukturprotein" aus der mi-1-Mutante gefordert worden ist (Woodward et al., 1966).

Es sprechen noch weitere Befunde dagegen, daß das nach Criddle (1962) präparierte Strukturprotein ein Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese ist. Das Strukturprotein fällt auf der Gelelektrophorese mit den Banden 10 und 11 zusammen. Diese werden in vitro nicht markiert. Weiter soll das Strukturprotein über 20 % der Mitochondrienproteine ausmachen. Nach unseren Abschätzungen bilden aber alle mitochondrial synthetisierten Proteine nicht mehr als 5-8 % des gesamten Mitochondrienproteins.

Die Ursache für den Aminosäureaustausch im Strukturprotein wäre eine Punktmutation der mitochondrialen DNS. Diese Erklärung für die mi-1-Mutation wird durch die oben beschriebenen Tatsachen nicht unterstützt. Es ist bis jetzt noch völlig unklar, durch welches Mutationsereignis sich das in vitro-Markierungsmuster in den Mitochondrien der mi-1-Mutante deuten läßt. Die Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigen jedoch, daß sich die cytoplasmatische Mutation in einer veränderten biosynthetischen Aktivität der isolierten Mitochondrien widerspiegelt.

5.4. Vergleich der Markierung in vitro mit der Markierung in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid

Die Markierungsmuster nach Markierung in vitro und in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid sind weitgehend identisch. Das zeigt, daß der Cycloheximid-resistente Aminosäureneinbau in vivo wirklich die mitochondriale Proteinsynthese repräsentiert. Andererseits bestätigen die in vivo-Versuche die Ergebnisse der in vitro-Experimente mit einer unabhängigen Methode.

Die Unterschiede in den Markierungsmustern lassen sich bis jetzt nicht erklären. Im Heuschreckenflugmuskel ist der in vivo-Einbau in die Bande 4 vergleichsweise höher als bei der in vitro-Markierung. Bei Neurospora fehlt in vivo der Einbau in die Banden 7, 13, 15 und 19.

Die Überlegenheit der in vivo-Markierung wird durch die folgenden Befunde nahegelegt. Im Gegensatz zur in vitro-Markierung sind nach dem in vivo-Einbau die mitochondrialen Ribosomen nicht mehr mit markierten unvollständigen Peptidketten assoziiert (Neupert et al., 1969)*. Die in vivo markierten Proteine sind zu 90 % mit dem Detergens Triton X-100 in Lösung zu bringen, während nach der in vitro-Markierung der Hauptteil unlöslich ist (Birkmayer et al., 1969).

Es ist bis jetzt mit keiner der beiden Markierungsmethoden gelungen, den Einbau in ein funktionell definiertes Protein nachzuweisen. Eine der Ursachen dafür sind sicher die extremen Schwierigkeiten, die bei der Präparation funktionsfähiger, undenaturierter Proteine aus der Mitochondrienmembran auftreten. Außerdem könnten die mitochondrial synthetisierten Proteine eine bis jetzt noch unbekannte Funktion ausüben. Die beiden genannten Probleme betreffen die Fraktionierung und Charakterisierung der mitochondrialen Membranen. Möglicherweise sind aber auch die bis jetzt angewandten Markierungsmethoden, sowohl in vitro als auch in vivo, ungeeignet für den Einbau von Aminosäuren in funktionsfähige Proteine. Mit der Gelelektrophorese in dem Phenolmedium werden nur denaturierte Peptidketten nachgewiesen. Es ist denkbar, daß diese Peptidketten nicht in ihren normalen Wirkungsort integriert werden, wenn die extramitochondriale Proteinsynthese gleichzeitig eliminiert wird, in vivo durch die Wirkung von Cycloheximid und in vitro durch die Isolierung der Mitochondrien aus der Zelle.

5.5. Verhalten der mitochondrialen Proteinsynthese in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid

Durch den Cycloheximid-resistenten Aminosäureeinbau werden nur die unlöslichen Mitochondrienproteine markiert (Tab. 2 und 3), und von diesen nur einige Fraktionen (Abb. 12 und 13).

*Dies trifft nur zu, wenn auf die Markierungsperiode ein "chase" folgt. Siehe S. 27.

Der Anteil dieser Fraktionen am gesamten Mitochondrienprotein wurde mit der unter 2.3.2. beschriebenen Methode auf 5 % geschätzt. Ein zweites unabhängiges Verfahren ergibt sich aus der Untersuchung des Cycloheximid-resistenten Aminosäureneinbaus, wenn man zugleich den intrazellulären Aminosäurenpool kennt.

In dem Neurospora-Experiment (Abb. 16) nimmt der 14 -C-Leucineinbau in die mitochondrialen Proteine mit der Dauer der Cycloheximidwirkung ab. Gleichzeitig steigt aber der Leucinpools, wie von Schwab gemessen (Sebald et al., 1969), stark an. Dies ist verständlich, da der Hauptweg der zellulären Proteinsynthese gestoppt ist, während die Leucinsynthese zunächst weiter läuft. Die aus dem 14 -C-Leucineinbau und dem Leucinpools berechnete mitochondriale Proteinsynthese nimmt mit der Dauer der Cycloheximidwirkung etwa linear ab. Zum extrapolierten Zeitpunkt Null der Cycloheximideinwirkung beträgt die Syntheserate für mitochondriales Protein noch etwa 8 % der Syntheserate in der Kontrolle ohne Cycloheximid. Das bedeutet, daß 8 % der Mitochondrienproteine von den Mitochondrien selbst synthetisiert werden.

Nach 45 Min. Cycloheximideinwirkung beträgt die Syntheserate noch 4 % der Kontrolle. Nach Zeiten länger als 2 Stunden wird kein Protein mehr synthetisiert. Es läßt sich abschätzen, daß die mitochondrial synthetisierten Proteine noch um etwa 15 % zunehmen, bevor unter der Wirkung von Cycloheximid die Synthese nach 2 Stunden aufhört.

5.6. Mögliche Funktionen der mitochondrial synthetisierten Proteine

Spekuliert man über das Produkt der internen mitochondrialen Proteinsynthese, so sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Zunächst haben wir zu unterscheiden zwischen stöchiometrischen und katalytischen Beiträgen zur Biogenese der Mitochondrien.

Ein stöchiometrischer Beitrag würde bedeuten, daß Bausteine gebildet werden, die in molaren Verhältnissen in die mito-

chondriale Struktur eingefügt werden. Solche Bausteine könnten Enzyme sein oder auch rein koordinierende Strukturelemente des Multienzymkomplexes.

Eine katalytische Funktion würde den Prozeß der Membranbildung betreffen. Der Beitrag würde hier in nichtmolarer Proportion zum Proteinhinhalte der fertigen Membran geleistet werden. Im Hinblick auf einen katalytischen Beitrag des internen mitochondrialen Systems gibt es verschiedene Denkmöglichkeiten.

1. Das gebildete Protein könnte Coenzyme synthetisieren, die zu Apoenzymen gehören, welche von der extramitochondrialen Proteinsynthese stammen. Es ist z.B. bekannt, daß die Ferrochelatase in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Jones et al., 1968), während das Apoprotein der Cytochromoxydase von der externen Proteinsynthese gebildet wird (Truppy et al., 1968).
2. Das Produkt des internen Systems könnte die Translokation oder Modifikation von Peptidketten bewirken, die außerhalb der Mitochondrien gebildet werden. Auf diese Weise könnte die spezifische Lokalisation von Enzymen in den Mitochondrien erklärt werden.
3. Das synthetisierte Protein könnte wirksam sein bei der Replikation der mitochondrialen DNS oder bei der Synthese der mitochondrialen RNS oder des Systems der mitochondrialen Proteinsynthese.

6. Zusammenfassung

1. a) Mitochondrien isoliert aus Wildtyp und cytoplasmatischer Mutante mi-1 von Neurospora crassa inkorporieren in vitro Aminosäuren in ihr Protein.
b) Die Abhängigkeit des Einbaus von den wesentlichen Parametern ist in Wildtyp und Mutante identisch, ebenso die Hemmung des Einbaus durch Chloramphenicol, Puromycin und Cycloheximid. Die Einbaurrate unter optimalen Bedingungen ist in der Mutante um den Faktor 5 niedriger.
2. a) Die mitochondriale Proteinsynthese im Wildtyp von Neurospora crassa und im Flugmuskel der Wanderheuschrecke arbeitet in vivo weiter, wenn der Aminosäureneinbau durch die extramitochondriale Proteinsynthese zu über 99 % gehemmt ist.
b) Die Abhängigkeit der Cycloheximid-resistenten mitochondrialen Proteinsynthese in vivo von der Konzentration des Hemmstoffes und der Dauer seiner Einwirkung sind untersucht worden. Danach können die Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese in vivo selektiv markiert werden. Verfälschung der Ergebnisse durch die Verunreinigung mit Bakterien oder Ribosomen sind bei der Methode ausgeschlossen.
3. In vitro und in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid werden innerhalb der Fehlergrenze nur die unlöslichen Mitochondrienproteine markiert.
4. Die unlöslichen Mitochondrienproteine können mit einer Gel-elektrophorese in einem Phenol-Ameisensäure-Medium in etwa 25 Banden aufgetrennt werden.
5. a) Die Verteilung der in vitro eingebauten ¹⁴C-Aminosäuren auf die elektrophoretischen Banden ist in Mitochondrien aus der Rattenleber, aus dem Flugmuskel der Wanderheuschrecke und aus dem Wildtyp von Neurospora

crassa ähnlich. Es treten 5-6 stark markierte Banden auf. Am höchsten markiert ist in den drei verschiedenen Mitochondrien die Bande 4, die sich in den drei Objekten nur wenig in der Wanderungsgeschwindigkeit unterscheidet.

b) Das Markierungsmuster in der cytoplasmatischen Mutante mi-1 von Neurospora ist im Vergleich zum Wildtyp verändert. Es fehlt die Markierung in der Bande 4. Damit äußert sich die cytoplasmatische Mutation in einer geänderten biosynthetischen Aktivität der isolierten Mitochondrien.

c) Das Markierungsmuster nach $^{14}\text{-C}$ -Aminosäureneinbau in vivo unter der Wirkung von Cycloheximid ist verändert im Vergleich zur Markierung in vivo ohne den Hemmstoff, aber sehr ähnlich dem Markierungsmuster nach $^{14}\text{-C}$ -Aminosäureneinbau in vitro.

d) Damit wird mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt, daß über die mitochondriale Proteinsynthese nur ein Teil der mitochondrialen Membranen gebildet wird. Der Anteil der mitochondrial synthetisierten Proteine am gesamten Mitochondrienprotein wird auf etwa 5 % geschätzt.

7. Literaturverzeichnis

Bauer, G. und G. Braunitzer,

Über die Anzahl der Proteinkomponenten im Lamellar-
system der Chloroplasten.

Naturwissenschaften, 54 (1967) 70

Bauer, G.,

Über Anzahl und Art der Membranproteine im Lamellar-
system der Chloroplasten.

Dissertation, München, 1968

Beattie, D. S., R. E. Basford and S. B. Koritz,

Bacterial contamination and amino acid incorporation
by isolated mitochondria.

J. Biol. Chem., 242 (1967) 3366

Beattie, D.S., R.E. Basford and S.B. Koritz,

The inner membrane as the site of the in vitro incor-
poration of L-14-C-Leucine into mitochondrial protein.

Biochemistry, 6 (1967) 3099

Beattie, D.S.,

Studies on the biogenesis of mitochondrial protein
components in rat liver slices.

J. Biol. Chem. 243 (1968) 4027

Beisenhertz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czock, K.H. Gar-

bade, E. Mayer-Arendt und G. Pfeleiderer,

Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydro-
genase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-De-
hydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur
in einem Arbeitsgang.

Z. Naturforschung, 8b (1953) 555

- Birkmayer, G. D., W. Sebald and Th. Bücher,
Nonlabeling of cytochromoxidase and labeling of a
Triton X-100 soluble fraction from in vivo labeled
mitochondria under the action of cycloheximide of
Neurospora crassa.
Europ. J. Biochem., (1969) submitted
- Borst, P., E.F.J. van Bruggen and G.J.C.M. Ruttenberg,
Size and structure of mitochondrial DNA.
In: Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria.
E.C. Slater, J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello (Edts.).
Adriatica editrice, Bari, 1968, p. 51.
- Bronsert, U. and W. Neupert,
Protein synthesis in locust-flight-muscle sarcosomes.
In: Regulation of metabolic processes in mitochondria.
J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E.C. Slater (Edts.).
Elsevier publishing company, Amsterdam, 1966, p. 426.
- Brosemer, R.W., W. Vogell und Th. Bücher,
Morphologische und enzymatische Muster bei der Ent-
wicklung indirekter Flugmuskeln von *Locusta migratoria*.
Biochem. Z., 338 (1963) 854.
- Clark-Walker, G.D. and A.W. Linnane,
In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mito-
chondrial protein synthesis with antibiotics.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 25 (1966) 8
- Clark-Walker, G.D. and A.W. Linnane,
The biogenesis of mitochondria in *Saccharomyces cere-
visiae*. A comparison between cytoplasmic respiratory-
deficient mutant yeast and chloramphenicol inhibited
wild type cells.
J. Cell Biol., 34 (1967) 1

Correns, C.,

Zur Kenntnis der Rolle von Kern und Plasma bei der Vererbung.

Z. induktive Abstammungs- und Vererbungslehre 2 (1909) 331

Criddle, R.S., R.M. Bock, D.E. Green and H. Tisdale,

Physical characteristics of proteins of the electron transfer system and interpretation of the structure of the mitochondrion.

Biochemistry, 1 (1962) 827

Criddle, R.S. and G. Schatz,

Promitochondria of anaerobically grown yeast.

I. Isolation and biochemical properties.

Biochemistry 8 (1969) 322

Eisenstadt, J.M. and G. Brawerman,

The protein synthesizing system from the cytoplasm and the chloroplasts of *Euglena gracilis*.

J. Mol. Biol., 10 (1964) 392

Ellis, R.J.,

Chloroplast ribosomes, stereospecificity of inhibition by chloramphenicol.

Science, 163 (1969) 477

Ephrussi, B.,

Die Bestandteile des Cytochrom-bildenden Systems der Hefe.

Naturwissenschaften, 43 (1956) 505

Granick, S. and A. Gibor,

The DNA of chloroplasts, mitochondria and centrioles.

In: Progress in nucleic acid research and molecular biology. J.N. Davidson, W.E. Cohn (Eds.).

Academic press, New York, 1967, Vol. VI p. 143.

- Greenawalt, J.W., D.O. Hall and O.C. Wallis,
Preparation and properties of Neurospora mitochondria.
In: Methods of enzymology, oxidation and phosphorylation.
R.W. Estabrook, M.E. Pullman (Edts.).
Academic press, New York, London, 1967, Vol X, p. 142.
- Hahn, F.E.,
Chloramphenicol.
In: Antibiotics, mechanism of action.
D. Gottlieb, P.D. Shaq (Edts.).
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967
Vol. I, p. 309.
- Haldar, D., K. Freeman and T.S. Work,
Biogenesis of mitochondria.
Nature, 211 (1966) 9
- Haskins, F.A., A. Tissieres, H.K. Mitchell and M.B. Mitchell,
Cytochromes and the succinic acid oxidase system of
poky strains of Neurospora.
J. Biol. Chem., 200 (1953) 819
- Henson, C.P., C.N. Weber and H.R. Mahler,
Formation of yeast mitochondria. I. Kinetics of amino
acid incorporation during derepression.
Biochemistry, 7 (1968) 4431
- Hunter-Jones, P.,
Instructions for rearing and breeding locusts in the
laboratory.
Anti-locust research centre, London, 1961.
- Jones, M.S. and O.T.G. Jones,
Evidence for the location of ferrochelatase on the
inner membrane of rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31 (1968) 977

Kadenbach, B.,

Synthesis of mitochondrial proteins:

Demonstration of a transfer of proteins from microsomes into mitochondria.

Biochim. Biophys. Acta, 134 (1966) 430

Kadenbach, B.,

Transfer of proteins from the microsomes into the mitochondria. Biogenesis of cytochrom c.

In: Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria.

E.C. Slater, J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello (Edts.).

Adriatica editrice, Bari, 1968, p. 415

Klingenberg, M. und Th. Bücher,

Flugmuskelmitochondrien aus *Locusta migratoria* mit Atmungskontrolle. Aufbau und Zusammensetzung der Atmungskette.

Biochem. Z., 331 (1959) 312

Kroon, A.M.,

Amino acid incorporation into the protein of mitochondria and mitochondrial fragments from beef heart.

Biochim. Biophys. Acta, 69 (1963) 184

Kroon, A.M.,

Protein synthesis in heart mitochondria.

I. Amino acid incorporation into the protein of isolated beef-heart mitochondria and fractions derived from them by sonic oscillation.

Biochim. Biophys. Acta, 72 (1963) 391

Küntzel, H. and H. Noll,

Mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from *Neurospora crassa*.

Nature, 215 (1967) 1340

Küntzel, H.,

Proteins of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes
from *Neurospora crassa*.

Nature, 222 (1969) 142

Lamb, A.J., G.D. Clark-Walker and A.W. Linnane,

The biogenesis of mitochondria.

IV. The differentiation of mitochondrial and cyto-
plasmic protein synthesizing systems by antibiotics.

Biochim. Biophys. Acta, 161 (1968) 415

Luck, D.J.,

Formation of mitochondria in *Neurospora crassa*.

A quantitativ radioautographic study.

J. Cell Biol. 16 (1963) 483

MacLennan, D.H. and A. Tzagaloff,

Studies on the mitochondrial adenosin triphosphatase
system. IV. Purification and charcterisation of the
oligomycin sensitivitiy conferring protein.

Biochemistry, 7 (1968) 1603

Maurer, H.R.,

Diskelektrophorese. Theorie und Praxis der diskon-
tinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1968.

Mc Lean, J.R., G.L. Cohn, I.K. Brandt and M.V. Simpson,

Incorporation of labeled amino acids into the protein
of muscle and liver mitochondria.

J. Biol. Chem., 233 (1958) 657

Mitchell, M.B. and H.K. Mitchell,

A case of "maternal" inheritance in *Neurospora crassa*.

Proc. Nat. Acad. Sci. US, 38 (1952) 442

- Mitchell, M.B., H.K. Mitchell and A. Tissieres,
Mendelian and non-mendelian factors affecting the
cytochrom system in *Neurospora crassa*.
Proc. Nat. Acad. Sci. US, 39 (1953) 606
- Mounolou, J.C., H. Jakob and P.P. Slonimski,
Mitochondrial DNA from Yeast "petite" mutants.
Specific changes of boyant density corresponding
to different cytoplasmic mutations.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 24 (1966) 218
- Nass, M.,
Mitochondrial DNA: Advances, problems and goals.
Studies of size and structure of mitochondrial DNA
relate to biogenesis and function of this organelle.
Science, 165 (1969) 25
- Neupert, W., D. Brdiczka and Th. Bücher,
Incorporation of amino acids into the outer and inner
membrane of isolated rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 27 (1967) 488
- Neupert, W.,
Zur Biogenese von Mitochondrien.
Über den Einbau von Aminosäuren in isolierte Mito-
chondrien des Flugmuskels der Wanderheuschrecke (*Locusta*
migratoria) und der Rattenleber.
Dissertation, München, 1967.
- Neupert, W., D. Brdiczka and W. Sebald,
Incorporation of amino acids into the outer and inner
membrane of isolated rat liver mitochondria.
In: Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria.
E.C. Slater, J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello (Edts.).
Adriatica editrice, Bari, 1968, p. 395.

Neupert, W., W. Sebald, A.J. Schwab, A. Pfaller and Th. Bücher,
Puromycin sensitivity of ribosomal label after incorporation of ^{14}C -amino acids into isolated mitochondria from *Neurospora crassa*.
Europ. J. Biochem., (1969) in press.

Neupert, W., W. Sebald, A.J. Schwab, P. Massinger and Th. Bücher,
In vivo incorporation of ^{14}C -amino acids into the proteins of mitochondrial ribosomes from *Neurospora crassa* sensitive to cycloheximide and insensitive to chloramphenicol.
Europ. J. Biochem., (1969) in press.

O'Brien, T.W. and G.F. Kalf,
Ribosomes from rat liver mitochondria.
I. Isolation procedure and contamination studies.
J. Biol. Chem., 242 (1967) 2172

Reich, E. and D.J.L. Luck,
Replication and inheritance of mitochondrial DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. US, 55 (1966) 1600

Roodyn, D.B., P.J. Reis and T.S. Work,
Protein synthesis in mitochondria.
Requirements for the incorporation of radioactive amino acids into mitochondrial protein.
Biochem. J., 80 (1961) 9

Roodyn, D.B., J.W. Suttie and T.S. Work,
Protein synthesis in mitochondria.
Rate of incorporation in vitro of radioactive amino acids into soluble proteins in the mitochondria, including catalase, malic-dehydrogenase and cytochrom c.
Biochem. J., 83 (1962) 29

Roodyn, D.B. and D. Wilkie,

- The biogenesis of mitochondria.
Methuen, London, 1968.

Schatz, G.,

- Oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien.
Angew. Chemie, 79 (1967) 1088

Schatz, G.,

- Impaired binding of mitochondrial adenosin triphosphatase
in the cytoplasmic "petite" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem., 243 (1968) 2192

Schneider, W.C.,

- J. Biol. Chem. 176 (1948) 259

Schwartz, J.H., R. Mayer, J.M. Eisenstadt and G. Brawerman,

- Involvement of N-formylmethionin in initiation of protein
synthesis in cell free extracts of *Euglena gracilis*.
J. Mol. Biol., 25 (1967) 571

Sebald, W., A. Schwab and Th. Bücher,

- Incorporation of amino acids into mitochondrial
membrane proteins.
In: 20. Mosbacher Colloquium, Inhibitors- tools in
cell research.
Th. Bücher, H. Sies (Edts.).
Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1969, p. 140.

Sherman, F. and P.P. Slonimski,

- Respiratory deficient mutants of yeast.
II. Biochemistry.
Biochim. Biophys. Acta, 90 (1964) 1

- Siegel, M.R. and H. D. Sisler,
Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. III. Further studies on the mechanism of action and on the mechanism of resistance in *Saccharomyces* species.
Biochim. Biophys. Acta, 203 (1965) 558
- Siegel, M.R. and H.D. Sisler,
Cycloheximide and other glutarimide antibiotics.
In: Antibiotics, mechanism of action.
D. Gottlieb, P.D. Shaw (Edts.).
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967
Vol. I, p. 283
- Spencer, D.,
Protein synthesis by isolated spinach chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys., 111 (1965) 381
- Tissieres, A., H.K. Mitchell and F.A. Haskins,
Studies on the respiratory system of the poky strains of *Neurospora*.
J. Biol. Chem., 205 (1953) 423
- Truman, D.E.S. and A. Korner,
Initial stages in the incorporation of amino acids into protein in rat liver mitochondria.
Biochem. J., 85 (1962) 154
- Tuppy, H. and G.D. Birkmayer,
Cytochromoxidase apoprotein in "petite" mutant yeast mitochondria. Reconstitution of cytochrom oxidase by combining apoprotein with cytohämin.
Europ. J. Biochem., 8 (1969) 237
- Vogel, H.J.,
A convenient growth medium for *Neurospora*
Microbiol. genet. Bull., 13 (1956) 42

Wettstein, D. von,

Nuclear and cytoplasmic factors in development of
chloroplast structure and function.

Can. J. Botany, 39 (1961) 1537

WeiB, H., G. von Jagow, M. Klingenberg and Th. Bücher,
Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria with
a grind mill and their characterisation.

Europ. J. Biochem., (1969) submitted.

Wheeldon, L.W. and A.L. Lehninger,

Energy-linked synthesis and decay of membrane proteins
in isolated rat liver mitochondria.

Biochemistry, 5 (1966) 3533

Wilkie, D.,

The cytoplasm in heredity.

Methuen, London; Wiley, New York, 1964

Wintersberger, E.,

Proteinsynthese in isolierten Hefe-Mitochondrien.

Biochem. Z., 341 (1965) 409

Woodward, D.O. and K.D. Muncres,

Alteration of a maternally inherited mitochondrial
structural protein in respiratory deficient strains
of *Neurospora*.

Proc. Nat. Acad. Sci. US 55 (1966) 872

Work, T.S.,

Elektrophoretic separation of the proteins of ribosome
subunits and of encephalomyocarditis virus.

J. Mol. Biol., 10 (1964) 544

Zilversmit, D.B., C. Entenman and M.C. Fishler,

J. gen. Physiol., 26 (1943) 325

L e b e n s l a u f

Als viertes von fünf Kindern des Pfarrers Rudolf Sebald und seiner Frau Christine, geborene Seitz, wurde ich am 21. September 1941 in Memmingen geboren. Hier besuchte ich ab 1947 die Volksschule und ab 1951 das humanistische Gymnasium. 1952 zogen meine Eltern nach München, wo ich im Juni 1959 das Reifezeugnis erhielt.

Im Wintersemester 1959/60 immatrikulierte ich mich an der Münchner Universität für das Fach Chemie. Im Sommer 1962 bestand ich das Vordiplom-, im Sommer 1965 das Hauptdiplomexamen. Seit September 1965 arbeite ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität München an meiner Diplom- und Doktorarbeit.

